

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**

"Cf2 en el desarrollo muscular embrionario de *Drosophila*"

Jorge Vivar González

Madrid, 2010

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

"Cf2 en el desarrollo muscular embrionario de *Drosophila*"

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas y en Bioquímica

Jorge Vivar González

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Margarita Cervera Jover
Catedrática de la Universidad Autónoma de
Madrid

Juan Jose Arredondo Lamas
Profesor Contratado Doctor de la Universidad
Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols". CSIC-UAM.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un Beca de Formación de Personal Investigador asociada al proyecto con título "Mecanismos transcripcionales asociados a la generación de diversidad muscular en *Drosophila*" y referencia (BFU2004-05384) por parte del Ministerio de Educación y Ciencia a Jorge Vivar González.

Margarita Cervera Jover, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la U.A.M. y **Juan Jose Arredondo Lamas**, Profesor Contratado Doctor de la U.A.M., como Directores de Tesis,

CERTIFICAN:

Que Don **Jorge Vivar González** con D.N.I.: 07250670-N, licenciado en Ciencias Químicas y en Bioquímica, ha realizado, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, el trabajo titulado "**Cf2 en el desarrollo muscular embrionario de *Drosophila***". Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid, Octubre 2010

Margarita Cervera Jover
Directora de Tesis

Juan Jose Arredondo Lamas
Director de Tesis

A Beni, a Morocha...
a Elena

**"...Darkness all around us
We don't close our eyes
No one's gonna ground us
We were born to fly
Comin' at us no stopping
Born to amplify
Carry on my sons forever
Carry on when I am gone
Carry on when the day is long
Forever Carry On
For as long as we're together then
Forever Carry On..."**

Joseph De Maio

Agradecimientos

Quiero, desde aquí, empezar agradeciendo a mis padres, Beni y Morocha, y a mi hermana, Elena, todo lo que han hecho por mí durante todos estos años, sin vuestro esfuerzo y sacrificio constantes mi vida no hubiera sido tan fácil. Gracias por animarme y permitirme siempre hacer lo que consideraba más correcto, y sobre todo gracias por estar siempre ahí, aun cuando con demasiada frecuencia mi elección finalmente no fue la más acertada...muchísimas gracias, nunca os podre agradecer lo suficiente vuestra forma de ser...os quiero. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por lo que me seguiréis enseñando, por todo el tiempo empleado en ayudarme a formarme intelectual y moralmente.

A mi directora de tesis, Margarita Cervera, quiero agradecerle la oportunidad que me proporciono introduciéndome en el mundo de la ciencia, aunque tal y como está este mundo, no sé yo si...es broma, te agradezco en serio la confianza que en su momento depositaste en mí. A lo largo de estos años he aprendido muchas cosas contigo en tu laboratorio, en el aspecto experimental y también en el personal. Gracias por la formación que me has proporcionado. Nunca podre olvidar estos años en el laboratorio. Gracias por la libertad experimental con la que me has obsequiado y por no dejar nunca de tratar de hacerme mayor y sobre todo por no desesperarte demasiado al no conseguirlo...

A mi otro director de tesis Juan, gracias por la paciencia demostrada conmigo a lo largo de estos años, por todo lo que me has enseñado, permitiéndome siempre aprender. Por todo el apoyo que me has proporcionado, en los buenos momentos y en los no tan buenos, que nunca malos. Siempre has tenido tiempo para hablar conmigo, ya fuese de ciencia o de la vida en general. Gracias por todos estos años en esa zona del laboratorio que, por mucho que Marga se enfadase y nos regañase los viernes, siempre ha parecido una zona tras un enfrentamiento bélico, la zona de las lupas de las moscas...en esas lupas he aprendido contigo de genética y de tantas otras cosas. Para mí siempre ha sido un placer que te involucrases en mi trabajo y ahora te lo agradezco por escrito. Gracias también por la libertad que me has proporcionado, por no imponerme nunca una forma de trabajar, por darme siempre tu opinión y sobre todo por dejarme elegir, permitiéndome aprender de mis errores personales. Gracias por el apoyo, por tu interés y por tus consejos científicos y no científicos.

Gracias a Miguel Fernández Moreno, no por ser mi tutor si no por participar en este trabajo, por no desesperar conmigo. Gracias por esos consejos acerca de la vida en general, gracias por estando tan liado como siempre estas encontrar esos ratitos para mí. Ha sido un enorme placer tenerte como tutor en mi trabajo.

A Sanford Bernstein por acogerme en su laboratorio en San Diego, por todo lo que aprendí durante los meses que duro mi estancia, por permitirme participar en su laboratorio, disfrutando, haciéndome sentir como uno más. Gracias también a toda la gente de su laboratorio, especialmente a Guirish Melkhiani y su mujer, Anju, gracias por preocuparos por mí como lo hicisteis, gracias por hacerme sentir como en casa, rodeado de gente que se preocupa por ti sin esperar nada a cambio, vuestros dos hijos tienen muchísima suerte. Gracias también al resto del grupo a Chi, James, Anthony, Jane y Nicky, hicisteis de mi estancia en ese laboratorio una experiencia inolvidable, científica y personalmente, no sería justo no decir que para mí fue un autentico placer pasar esos meses aprendiendo y trabajando con todos vosotros.

A Lark por proporcionarme un alojamiento y una conversación siempre animada y distraída. Siempre fue un placer salir del laboratorio y tomarme algo contigo en el jardín, hablando de cualquier cosa en general, siempre con curiosidad. Gracias por la complicidad mostrada, me alegro mucho de que actualmente sigamos siendo amigos, espero sinceramente que nos volvamos a ver pronto.

A toda la gente del antiguo laboratorio B18, donde empecé hace ya unos años, Raquel, Jose, Elena, Susana, Yoli, Vanesa, Vero, muchísimas gracias por la ayuda prestada. Ha pasado tanto tiempo que ya no andáis casi ninguno por aquí, pero os tengo a todos muy presentes en el día a día del laboratorio. Con vosotros aprendí el placer de trabajar en equipo, en aquellas épocas en las que no había listas de tareas pero aun así nunca faltaba de nada. Gracias a Raquel, a Jose, y a Susana, por la de tardes que se nos ha hecho de noche con las moscas, y que bien se estaba a esas ultimas horas en las que solo quedábamos en el pasillo los cuatro o cinco "tontos" de siempre, cuando se subía la música y se relajaban las tensiones del día a día. Un placer haber pasado esos ratos con vosotros. Tengo que agradecer de una forma especial a Raquel Marco Ferreres, con quien empecé mis andanzas en el laboratorio, sin la que nada de esta tesis hubiese sido posible. Por todo lo que me enseñaste y por lo bien que lo hiciste, sigo pensando que fue una suerte haber empezado en esto viéndote trabajar, siguiéndote a todas partes. Gracias por compartir conmigo la poyata en esos mis primeros momentos en el labo y por no perder nunca la paciencia por mi desorden caótico y generalizado. Gracias por la confianza mostrada, por transmitirme la pasión por lo que se hace en cada momento y por lo mucho que me ayudaste durante tanto tiempo. También ha sido un placer aprender contigo Jose, sé que me costara mucho encontrar alguien con un carácter como el tuyo, siempre tan tranquilo y con una sonrisa, da igual lo bajo que te encuentres es hablar un rato con Jose y todo parece mucho más pequeño y carente de importancia, lo dicho un autentico placer el haberte conocido en lo personal y en lo laboral. De Susana, la Dr. Peralta, que voy a decir aparte de que es

genial. Entramos en el labo en el mismo tiempo y para mí ha sido un gustazo el trabajar contigo a lo largo de todos estos años. Siempre serás un ejemplo de superación personal y compañerismo, siempre te has preocupado por mí y por mi trabajo. Nadie se ha ofrecido y me ha ayudado tantas veces a lo largo de todos estos años con las moscas como tú. Eres un sol. Gracias también a Vero, por esa forma suya de echarme la bronca, que siempre terminaba con un no te enfades conmigo...pero como podía enfadarme yo contigo...mil gracias a todos por el trato siempre recibido.

A toda la gente del laboratorio actual que ahora es el B20, Leticia, Mari Cruz, Raquel, Lucia, y David por todos los buenos momentos de los últimos años, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Leticia y a la frescura que aportó con su llegada, hace algún tiempo ya. Espero que la vida tarde mucho en hacerte perder ese espíritu juvenil. Gracias por ayudarme en este trabajo con la realización del anticuerpo contra Cf2 sin el que buena parte de este trabajo no habría sido posible. Gracias por esos buenos ratos, por hablar siempre claro, por esas "reuniones de trabajo" de menú tan variado...ya sabes...por perdonarme cuando llego tarde y más aun cuando no llego...

A Mari Cruz por siempre tener tiempo para hablar de mis experimentos, gracias por escuchar y dejar hablar, son dos cualidades que hoy en día no abundan. Gracias por los buenos ratos, tan necesarios, que hemos pasado en las lupas con Radio3 y bromeando siempre con que nos habíamos equivocado de profesión entre risas y pipetas, pinzas y moscas.

A Raquel, Lucia y David por estar siempre dispuestos a colaborar y por vuestras contribuciones que han mejorado este trabajo. Gracias David por ese punto de locura que proporciona un físico (¿teórico?) convencido en un laboratorio de bioquímica. Gracias por las aportaciones dentro y fuera del laboratorio que han contribuido a mejorar mi ánimo cuando este flaqueaba. También por sacar siempre un rato para interesarte por mis cosas y estar siempre dispuesto a echarme una mano, en serio gracias.

Gracias a Rafael Garese y a toda la gente de su laboratorio, el B19, por siempre tener lo que faltaba en nuestro labo y sobretodo por compartirlo. Álvaro, gracias por siempre tener unas palabras de ánimo en los momentos más crudos, por recordarme todos los plazos administrativos que sin ti se me hubiesen pasado, gracias, sigue siempre igual, tan sereno y cabal. Gracias a Lucia, Paula, Vero, por todos esos cigarros que hemos compartido en tiempos perdidos entre experimentos. Por compartir vuestro trabajo y preguntar por el mío durante todo este tiempo. A Rosana, por su organización y por el aguante demostrado con las moscas y su almacenamiento. A Pilar por animarme a seguir en los principios más duros cuando no parecía haber muchas oportunidades,

gracias por los gritos desde el otro extremo del pasillo, por siempre tener una sonrisa para mí, por ayudarme a ver cómo era esto. Gracias también a Esther, Mari Carmen y toda la gente que ha ido pasando por ese laboratorio que siempre ha sido como un "hermano responsable". Gracias por todos esos seminarios conjuntos que aportaban otras visiones. Ha sido un placer compartir con vosotros todo este tiempo y trabajo.

Gracias a toda la gente de los laboratorios del pasillo de bioquímica. Gracias Rosalía, fue un placer verte trabajar. Gracias a la gente del laboratorio de Jesús Cruces, por ser tan generosas como el B19. Gracias Jesús, por todas las herramientas prestadas a lo largo de este tiempo y por nunca tener prisa en las celebraciones. Gracias a Bea, Oiane, Madalina, por poder contar siempre con vuestra colaboración, no os imagináis la de veces que me habéis salvado...con el pinta uñas... en serio gracias por toda la ayuda prestada,

Gracias a Enrique Tabarés y a su becaria, Laura, que ya tampoco anda por aquí. Gracias por aceptarme en el laboratorio y por todo lo que me habéis enseñado, sin vuestra ayuda gran parte de esta tesis no se podría haber llegado a realizar con tanta facilidad.

Gracias al personal de los diversos servicio de la UAM. A la gente del servicio Confocal gracias por casi adoptarme en el servicio. A Lola y Ana, por haber hecho de los cientos de horas ante el confocal unos ratos agradables. Por ayudarme en todo lo que habéis podido. Por acordaros de mí cuando quedaban huecos libres, por los "experimentos a dos bandas" y por la libertad con que siempre me habéis permitido trabajar, soportando mis constantes olvidos en asuntos administrativos. Espero no haberos dado muchos problemas.

Gracias a la gente de informática, especialmente a Toño, por atendernos a todos siempre tan bien y siempre con una sonrisa.

Gracias también a todo el servicio de Medios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, la famosa "COCINA", por ser siempre tan majas, por perdonarme el llegar fuera de hora, por diversos motivos a lo largo de estos años. Especialmente quiero agradecer a Raquel Hermoso nuestra "Chef" de las moscas, por la de tiempo que nos ha ahorrado haciéndonos la comida de nuestras moscas. Gracias por tener siempre un rato para hablar conmigo de lo que fuese. Gracias por no enfadarte con los "robos" constantes de levadura a horas tardías, gracias por siempre tener una sonrisa y por la serenidad demostrada conmigo.

Se que se me olvida mucha gente que ha pasado por aquí a lo largo de estos años, os pido disculpas, pero tan solo nombrar toda la gente a la que debo estar agradecido haría de esta tesis algo interminable. Ha sido un enorme placer trabajar con todos vosotros todo este tiempo.

A mis amigos de toda la vida, mi gente del PNA, gracias por estar ahí durante...¿cuanto tiempo?... en algunos casos casi 30 años, se dice pronto... Gracias a todos por estar ahí, siempre disponibles para lo que sea, donde sea, por preocuparos por mí, se que muy a menudo no ha sido fácil. Gracias por no tener en cuenta las infinitas veces que he llegado tarde (cuando he llegado) porque me quedaban 10 minutos en el labo que al final se convertían en...

Gracias también a toda la gente con la que estudie en la Universidad y que aún siguen siendo mis amigos. A Laura, siempre serás "la morena" gracias por todo el apoyo y cariño demostrado en las primeras etapas de esta tesis. Gracias por todo lo que aprendimos juntos, como tú dices es una pena que nuestros caminos cada vez se alejen más. Al Chino, por su labor logística incansable, a Tony a Jacinto, gracias por muchas noches inolvidables....ya sabéis un placer haberos conocido y poder consideraos mis amigos.

Gracias Laura, por tu paciencia, comprensión, tranquilidad y cariño, sabes cuánto me has ayudado. Gracias por participar en mi vida y en esta tesis con tu entrañable carácter, aportándome tantas cosas que me faltan. Me has acompañado en esta dura etapa ayudándome siempre, con esa enorme paciencia que siempre demuestras. Qué suerte tienen los niños a los que das clases. Sabes cuánto he dedicado a este sueño, cuanta energía, tiempo e ilusión, gracias por implicarte, por comprenderme y por alentarme siempre a seguir hacia adelante. A lo largo de este tiempo me has visto desesperar en multitud de ocasiones y aun así tu siempre has estado ahí, a mi lado, ayudándome y animándome. Muchísimas gracias por ser siempre como eres y por estar siempre ahí, te quiero.

Resumen/Summary

Resumen

El factor de transcripción Chorion factor 2 (Cf2) fue inicialmente identificado por su participación en el establecimiento del patrón dorso-ventral durante la ovogénesis. En este trabajo se han estudiado los efectos que producen los cambios de expresión de *Cf2* en el desarrollo del sistema muscular de *Drosophila*. Este estudio se ha realizado utilizando distintas aproximaciones que permiten observar los cambios fenotípicos que se producen en el sistema muscular tras variaciones de expresión del factor.

Los resultados obtenidos indican que los niveles de Cf2 han de estar estrictamente regulados ya que cambios acusados en la expresión de *Cf2* causan letalidad en individuos homocigotos. Los estudios funcionales realizados con objeto de dirimir su cometido concreto en la miogénesis, indican que Cf2 participa tanto en la miogénesis somática como en la cardíaca. Así, se ha demostrado que alteraciones en los niveles de expresión del factor inducen cambios significativos en el número de núcleos por fibra muscular que perturban posiblemente el tamaño final de la fibra y también la organización, morfología y número de fibras somáticas presentes en cada hemisegmento, alterando, por tanto, el patrón muscular embrionario. El mecanismo de cómo se efectúa es actualmente desconocido. Los datos apuntan a que *Cf2* puede participar, o bien en el proceso de especificación de los precursores y/o en la división asimétrica que produce las células fundadoras o progenitores musculares.

En la cardio-miogénesis, los cambios de nivel de Cf2 provocan alteraciones en el número total de cardioblastos, células pericárdicas y también en su especificación. Las variaciones afectan a la morfología del conducto dorsal y probablemente también a su funcionalidad mediante un mecanismo aún ignorado que puede afectar o bien, al proceso de especificación de los progenitores cardíacos, o a los procesos de división simétrica o asimétrica que experimentan los progenitores de cada tipo de cardioblasto durante la generación del conducto dorsal en *Drosophila*. La presencia de Cf2 parece potenciar la adquisición de un destino muscular (somático o cardíaco).

Adicionalmente, se ha clarificado la relación de Cf2 con Mef2. Cf2 modula los niveles de expresión de Mef2 en etapas en las que ambos factores se co-expresan durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, siendo capaz de modificar tanto los niveles de mRNA de *Mef2*, como los de proteína, indicando la existencia de un posible mecanismo de retroalimentación entre ambos factores en etapas de la diferenciación muscular. La función de Cf2 en la especificación y diferenciación de los precursores musculares (somáticos y cardíacos) es, al menos, parcialmente independiente de Mef2.

Summary

The transcription factor Chorion factor 2 (Cf2) was initially identified by its role in establishing the dorso-ventral pattern during oogenesis. In this work we have analyzed the effects that perturbations in Cf2 expression levels produce in muscle formation during *Drosophila* development. This study was carried out using different approaches that allowed us to analyze the phenotypic changes that take place after variations in Cf2 expression in embryo muscles.

Our results indicate that Cf2 levels must be tightly regulated since marked alterations in the Cf2 expression cause lethality in homozygous flies. In order to determine its specific role in myogenesis we carried out functional studies. Cf2 is involved in both somatic and cardiac myogenesis. It has been shown that alterations in its expression levels induce significant changes in the number of nuclei per muscle fiber. Probably this effect disturbs the final size of the fiber as so does with the organization, morphology and total number of somatic fibers present in each hemisegment. Therefore, it alters the embryonic muscle pattern. The mechanism by which this process occurs is currently unknown. Our data suggest that Cf2 may participate either in the precursor specification process and / or in the asymmetric divisions that produces muscle founder cells or progenitors.

During cardiogenesis, changes in the Cf2 levels produce alterations not only in the total number of cardioblasts and pericardial cells but also in their specification. The changes affect the morphology of the dorsal vessel, and probably its functionality. The specific role played by Cf2 in those processes is still ignored but Cf2 may participate in the specification process of cardiac progenitors, or symmetric / asymmetric division experienced the progenitors of each cardioblast lineage during the dorsal duct generation *Drosophila*. Cf2 over-expression appears to enhance the acquisition of a muscle fate (somatic or cardiac).

Finally, this work has clarified in more detail the relationship between Cf2 and Mef2. Cf2 modulates Mef2 expression levels in the stages when both factors are co-expressed throughout embryonic development of *Drosophila*. Cf2 is able to modify both mRNA and protein levels of Mef2, indicating the possible existence of a feedback mechanism between these two factors in during muscle differentiation. Moreover, the Cf2 function in the specification and differentiation of somatic and cardiac muscle precursors is, at least partially, independent of Mef2.

Contenido

Agradecimientos	5
Resumen/Summary	11
Resumen	12
Summary	13
Índice	14
Abreviaturas	17
Introducción	20
1. El sistema muscular de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
2. Miogénesis de <i>Drosophila</i>	23
2.1.La formación de la musculatura somática.....	25
2.2. El corazón de <i>Drosophila</i> : Conducto Dorsal	29
2.3 Musculatura visceral	32
3. El factor de transcripción Mef2 en <i>Drosophila</i>	33
4. El factor de transcripción Cf2 en <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Objetivos	41
Materiales y Métodos	43
MATERIALES	44
1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	44
2. Cepas bacterianas.	45
3. Plásmidos.	45
4. Oligonucleótidos.	47
5. Anticuerpos y fluoróforos.	48
6. Medios de Cultivo.	49
MÉTODOS	51
1. Microinyección de dsRNAi.....	51
2. Producción anticuerpos policlonales de conejo.	52
3. El sistema UAS/ Gal4.	55
4. Inmuno-histoquímica.	60
5. Cuantificación de los niveles de mRNA.	60
Resultados	65
Cf2 y el desarrollo embrionario temprano: Microinyección de dsRNAi en embriones tempranos de <i>Drosophila</i>	65

Los niveles de Cf2 deben estar fuertemente regulados durante el desarrollo embrionario.	67
Cf2 modula los niveles de Mef2 durante el desarrollo embrionario.	73
Cf2 participa en el control del número de núcleos por fibra muscular.	75
La alteración de los niveles de expresión de Cf2 produce alteraciones en el patrón muscular embrionario.	77
Variaciones en los niveles de expresión de Cf2 inducen variaciones el número de cardiomiocitos presentes en corazón de <i>Drosophila</i>	80
Las variaciones en los niveles de Cf2 se reflejan en todos los linajes de cardioblastos.	85
Cf2 participa en la determinación de los diferentes linajes de células pericárdicas.	87
La función de Cf2 en la especificación de los precursores cardiacos es independiente de Mef2.	95
Discusión	97
Conclusiones	111
Bibliografía	113

Abreviaturas

aa	Aminoácido.
Act	Actina.
Act57B	Actina 57B.
Act5C	Actina 5C.
AEL	Tras la deposición del embrión (After Egg Lay).
ap	<i>apterous</i> .
APF	Después de la formación del pupario (After Puparium Formation).
bap	<i>bagpipe</i> .
b-HLH	Helice-Lazo-Helice básico(Basic Helix-Loop-Helix).
BSA	Albúmina de suero bovino.
byn	<i>brachyenteron</i> .
Cf2	<i>Chorion Factor 2</i> .
Chc	<i>Cadena Pesada de la Clatrina</i> .
CyO	Curly of Oyster.
DFM	Músculos Directos de Vuelo.
Dl	<i>Delta</i> .
DLM	Músculos Dorsales Laterales.
Doc	<i>Dorso-cross</i> .
dpp	<i>decapentaplegic</i> .
dsRNA	RNA de Doble cadena.
duf	<i>dumb founded (kirre)</i> .
DVM	Músculos Dorso-ventrales.
EGF R	Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico.
EDTA	Etilendiamintetracetato.
EGTA	Acido tetra acético Etilen Glicol.
eve	<i>even-skipped</i> .
FC	Célula Fundadora.
GAM	Anticuerpo secundario de cabra contra ratón (Goat Anti-Mouse antibody).
GAR	Anticuerpo secundario de cabra contra conejo (Goat Anti-Rabbit antibody).
gcm	<i>glial cells missing</i> .
GFP	Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein).
grk	<i>gurken</i> .
GST	Glutation S-Transferasa.
hbs	<i>hibris</i> .
Hh	<i>hedgehog</i> .
IFM	Músculo Indirectos de Vuelo.
insc	<i>inscuteable</i> .
IPTG	Isopropil-β-D-1-Tiogalactopiranósido
IRE	Intronic Regulatory Element.
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodalton.
kirre	<i>kin of irre</i>
kr	<i>kruppel</i> .
l(2)B73	<i>lethal (2) B73</i> .
l(2)DA2	<i>lethal (2) DA2</i> .
l'sc	<i>lethal of scute</i> .
lb	<i>ladybird</i> .
lbe	<i>ladybird early</i> .
lbl	<i>ladybird late</i> .
lmd	<i>lameduck</i> .
MADS	Acrónimo MCM1 Agamous Deficiens SRF
mbf	<i>muscleblind</i> .
mbc	<i>myoblast city</i> .
MCF	Mioblastos Competentes de Fusión.
Mef2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i> .

MKRS	Marcador cromosoma 3 con la mutación Stubble.
<i>mlc1</i>	<i>Cadena ligera de la miosina I (Myosin alkali light chain 1).</i>
<i>mlp60A</i>	<i>muscle LIM protein at 60A.</i>
<i>mlp84b</i>	<i>muscle LIM protein at 84b.</i>
MOPS	3 morfolinopropano 1 Acido sulfónico
<i>Mp20</i>	<i>Muscle protein 20.</i>
<i>MRF4</i>	<i>Myogenic Regulatory Factor 4.</i>
Mv	Mesodermo visceral.
<i>Myf5</i>	<i>Myogenic Factor 5.</i>
<i>MyHC</i>	<i>Cadena Pesada de la Miosina.</i>
<i>MyoD</i>	<i>Myogenic Differentiation.</i>
<i>N</i>	<i>Notch.</i>
<i>nau</i>	<i>nautilus.</i>
NGS	Suero Normal de Cabra.
<i>NK2</i>	<i>Natural Killer 2.</i>
<i>nmr1</i>	<i>Gen H15.</i>
<i>odd</i>	<i>odd-skipped.</i>
PA	Precursor de músculo Adulto.
PBS	Solución tamponada con fosfatos (Phosphate-Buffered Saline).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
Prm	Paramiosina.
<i>prc</i>	<i>pericardina.</i>
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa.
RNAi	RNA Interferente.
<i>rst</i>	<i>roughest.</i>
RT PCR	Transcripción Reversa y Reaccion en Cadena de la Polimerasa.
SDS	Dodecil Sulfato Sódico.
<i>slp</i>	<i>sloppy paired.</i>
<i>slp1</i>	<i>sloppy-paired 1.</i>
<i>sns</i>	<i>sticks and stones.</i>
<i>spdo</i>	<i>sanpodo.</i>
ssRNA	RNA de cadena Simple.
<i>svp</i>	<i>seven-up.</i>
Tb	Tubby.
TDT	Musculo Tergal Depresor del Trocanter.
TGF- β	Transforming Growth Factor β .
<i>tin</i>	<i>tinman.</i>
<i>Tm1</i>	<i>Tropomiosina 1.</i>
<i>Tm2</i>	<i>Tropomiosina 2.</i>
Tm3Ser	Balanceador cromosoma 3 con la mutacion Serrate.
TM6Tb	Balanceador cromosoma 3 con las mutaciones Tubby y Humeral.
<i>tnI</i>	<i>troponina I.</i>
<i>tnT,</i>	<i>troponina T.</i>
<i>twi</i>	<i>twist.</i>
UAS	Upstream activating sequence.
URE	Upstream Regulatory Element.
<i>ush</i>	<i>u-shaped.</i>
<i>vg</i>	<i>vestigial.</i>
<i>w</i>	<i>white.</i>
<i>wg</i>	<i>wingless.</i>
<i>wt</i>	Tipo silvestre (Wild-Type).
<i>yw</i>	<i>yellow white.</i>
<i>zfh1</i>	<i>zinc finger homeodomain 1.</i>
β -3tub60D	β 3-tubulin at 60D.

Introducción

Introducción

La regulación de los genes que codifican proteínas sarcoméricas es un proceso primordial en la formación de los músculos. La precisión en el proceso es esencial en algunas situaciones como pueden ser el mantenimiento de los niveles umbral de un regulador o asegurar la estequiometría correcta en el ensamblaje de complejos multi-proteicos como es el caso del aparato contráctil de la fibra muscular. Las proteínas musculares se acumulan en cada tipo de fibra o músculo en cantidades variables manteniendo siempre una estequiometría muy precisa. Sin embargo, los mecanismos que garantizan que estos genes expresen la cantidad de proteína adecuada en cada momento y tejido son poco conocidos. (Arredondo et al. 2001; Marco-Ferreres et al. 2005; García-Zaragoza et al. 2008).

El ensamblaje del aparato contráctil del músculo y más concretamente de su unidad básica, el sarcómero (Figura 1), requiere tanto la co-activación de un grupo de genes que codifican proteínas musculares como la adquisición de altos niveles de expresión de proteína en un periodo de tiempo corto. En este contexto, es importante insistir en que la estequiometría entre las diferentes proteínas sarcoméricas es esencial para su correcto funcionamiento. Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que, en *Drosophila*, los niveles de transcripción de genes sarcoméricos co-regulados como son los de la *tnT*, *tnI*, *MyHC*, *Tm1* y *Tm2*, etc, están controladas por, al menos, dos elementos activadores, URE (Upstream Regulatory Element) e IRE (Intronic Regulatory Element). Estos activadores interaccionan de forma sinérgica, concertada y diferencial en cada tipo muscular para establecer los niveles de expresión adecuados en cada músculo, adaptando la expresión de cada gen a las necesidades específicas de cada fibra muscular. Estos elementos están situados en la región 5', URE, y en el intrón 1 del gen, IRE (Figura 1B; Mas et al. 2004; Marco-Ferreres et al. 2005; García-Zaragoza et al. 2008).

El análisis comparativo entre secuencias homologas de distintas familias de *Drosophila* ha permitido discernir que estos elementos reguladores están organizados en módulos funcionales, de entre 300 y 900 pb (García-Zaragoza et al. 2008). En ensayos *in silico*, se ha comprobado que estos elementos reguladores cuentan con agrupaciones de sitios de unión para diferentes factores de transcripción, de entre los que se han podido identificar Mef2 y Cf2 (García-Zaragoza et al. 2008). Cf2 y Mef2 son dos factores de transcripción que se expresan en músculo, en los tres linajes musculares (ver apartados 4 y 5 de Introducción). El factor de transcripción Mef2 ha sido ampliamente descrito como un factor miogénico esencial en la formación del músculo (Bour et al. 1995). Requiere de la interacción con otros factores y co-factores, algunos de los cuales son conocidos, para garantizar que se alcancen los niveles correctos de expresión en cada tipo de músculo (Morin et al. 2005; Tanaka et al. 2008). En vertebrados, la interacción de Mef2 con miembros de la familia MyoD ha sido

ampliamente estudiada (Black et al. 1998; Kassar-Duchossoy et al. 2004), sin embargo, en *Drosophila* no se conocen homólogos claros de la familia de MyoD.

Cf2, es un factor de transcripción que inicia su expresión en la misma etapa del desarrollo embrionario de *Drosophila* que Mef2 (5-6 horas después del comienzo del desarrollo). Igualmente ha sido descrito que cambios en los niveles de Mef2 ó Cf2 alteran la expresión de las proteínas sarcoméricas y como consecuencia se pierde el balance estequiométrico entre ellas produciéndose defectos musculares (Bagni et al. 2002; García-Zaragoza et al. 2008).

1. El sistema muscular de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster, como insecto holometábolo, posee un ciclo vital dividido en dos fases. Tras el desarrollo embrionario, hay una primera fase de larva que posteriormente sufre un proceso de metamorfosis en el que se genera el individuo adulto (ver Figura 2A). En *Drosophila*, el desarrollo embrionario dura a 25°C aproximadamente 24 horas. Tras este periodo, emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza metamorfosis durante la que se histolizan la mayoría de los tejidos larvarios. Los tejidos del individuo adulto se generan mayoritariamente a partir los discos imaginales. El adulto emerge aproximadamente al décimo día del desarrollo (Campos-Ortega et al. 1985). Por tanto, durante el desarrollo de *Drosophila* se producen dos sistemas musculares, los músculos embrionarios/larvarios y los músculos del adulto.

A diferencia de lo que ocurre en vertebrados, los músculos de la mosca, son siempre de apariencia estriada y están formados por una sola fibra muscular multi-nucleada, con la excepción del corazón. En la larva, hay tres tipos fundamentales de músculo, los músculos hipodérmicos, los músculos viscerales y el músculo cardíaco. Los músculos hipodérmicos son músculos esqueléticos y tienen dos funciones, por una parte se encargan de mantener la forma de la larva y por otra le proporciona el movimiento mediante el acortamiento y alargamiento del cuerpo (Bate 1990; Bate et al. 1993). Cada segmento abdominal se compone de 30 pares de músculos hipodérmicos (Figura 2B y Figura 3). Todos estos músculos son fisiológicamente idénticos, aunque cada uno de ellos es único en términos de tamaño, forma y puntos de anclaje e inervación. Los músculos viscerales recubren el tubo digestivo formando dos capas, una longitudinal y otra transversal. El músculo cardíaco, en *Drosophila*, forma el conducto dorsal, la estructura equivalente al corazón de vertebrados. Todos estos músculos son súper-contráctiles, es decir, tienen una gran capacidad para contraerse pudiendo pasar los microfilamentos a través del disco Z del extremo del sarcómero.

En el adulto, aparecen una serie de músculos especializados en el vuelo y funciones relacionadas. La mayor parte del volumen torácico está ocupado por los músculos indirectos de vuelo, IFM, y los

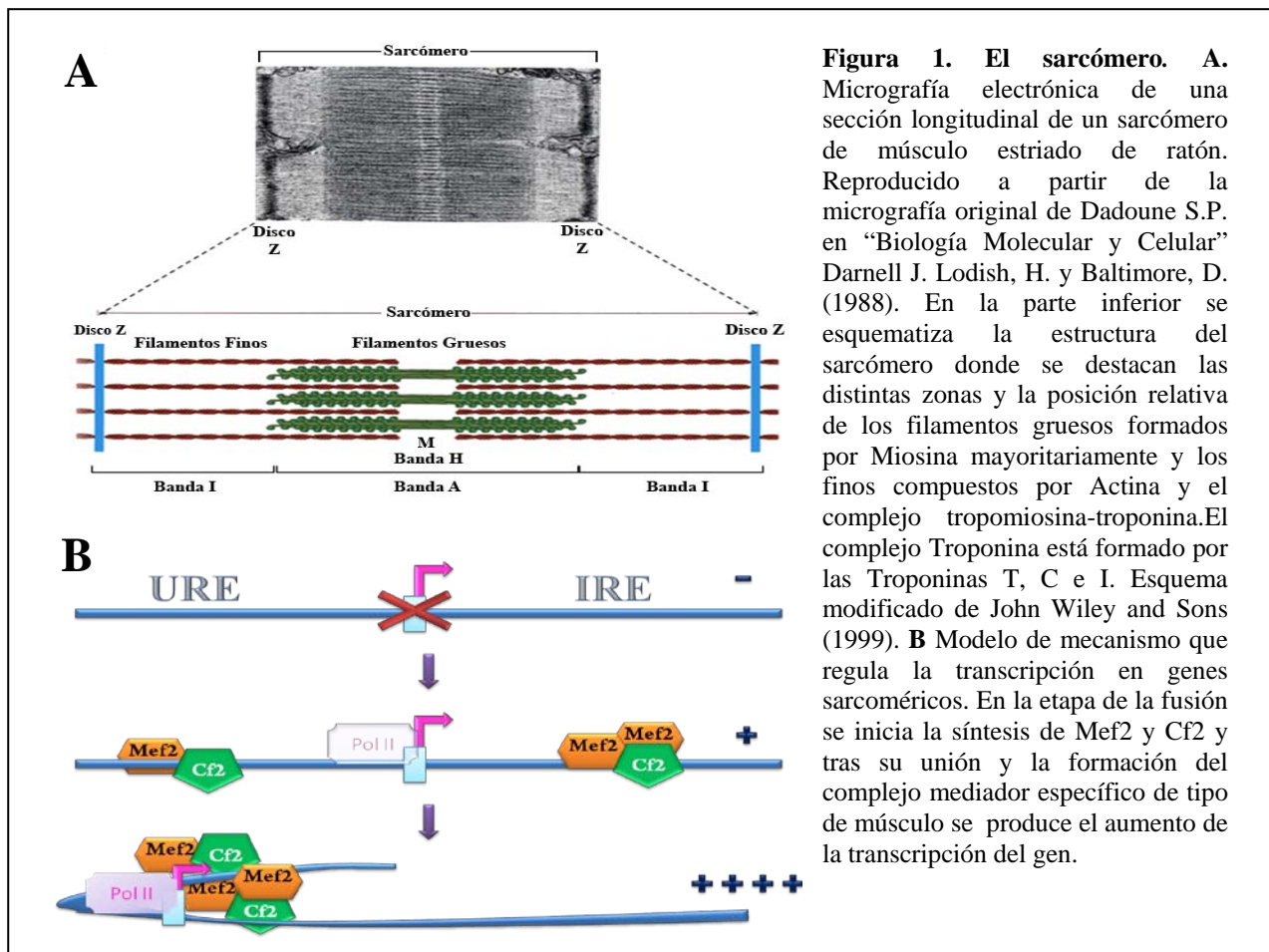


Figura 1. El sarcómero. **A.** Micrografía electrónica de una sección longitudinal de un sarcómero de músculo estriado de ratón. Reproducido a partir de la micrografía original de Dadoune S.P. en “Biología Molecular y Celular” Darnell J. Lodish, H. y Baltimore, D. (1988). En la parte inferior se esquematiza la estructura del sarcómero donde se destacan las distintas zonas y la posición relativa de los filamentos gruesos formados por Miosina mayoritariamente y los finos compuestos por Actina y el complejo tropomiosina-troponina. El complejo Troponina está formado por las Troponinas T, C e I. Esquema modificado de John Wiley and Sons (1999). **B** Modelo de mecanismo que regula la transcripción en genes sarcoméricos. En la etapa de la fusión se inicia la síntesis de Mef2 y Cf2 y tras su unión y la formación del complejo mediador específico de tipo de músculo se produce el aumento de la transcripción del gen.

depresores tergaes del trocánter, TDT (Figura 2B). Son los encargados de producir el batido de las alas al actuar sobre el exoesqueleto del insecto. Los IFM son músculos fibrilares, teniendo morfológicamente la estructura más ordenada de todos los músculos de la mosca. Cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos formando una red hexagonal, típica de este tipo de músculo. Los músculos IFM se contraen asincrónicamente, se contraen con mayor frecuencia de la que son estimulados por el sistema nervioso (Bernstein et al. 1993). Los músculos TDT son una pareja de músculos que actúan sobre el segundo par de patas induciendo el salto de la mosca como paso inicial para comenzar el vuelo. Estos músculos son tubulares y se contraen sincrónicamente, una vez por cada estímulo nervioso. Además de estos tipos de músculo, en el adulto encontramos otros músculos también tubulares, como son los músculos directos de vuelo (DFM), los de las patas, los hipodérmicos.

2. Miogénesis de *Drosophila*.

La formación de cada músculo o fibra muscular, con propiedades electro-fisiológicas, metabólicas y contráctiles específicas, es un proceso complejo que transcurre de una forma secuencial e implica múltiples mecanismos de regulación génica (Stockdale 1997; Hughes et al. 1999; McKinsey et al. 2002). En este proceso una amplia batería de genes, que codifican para proteínas específicas musculares, se ha de activar de forma muy rápida y coordinada para que finalmente sus productos

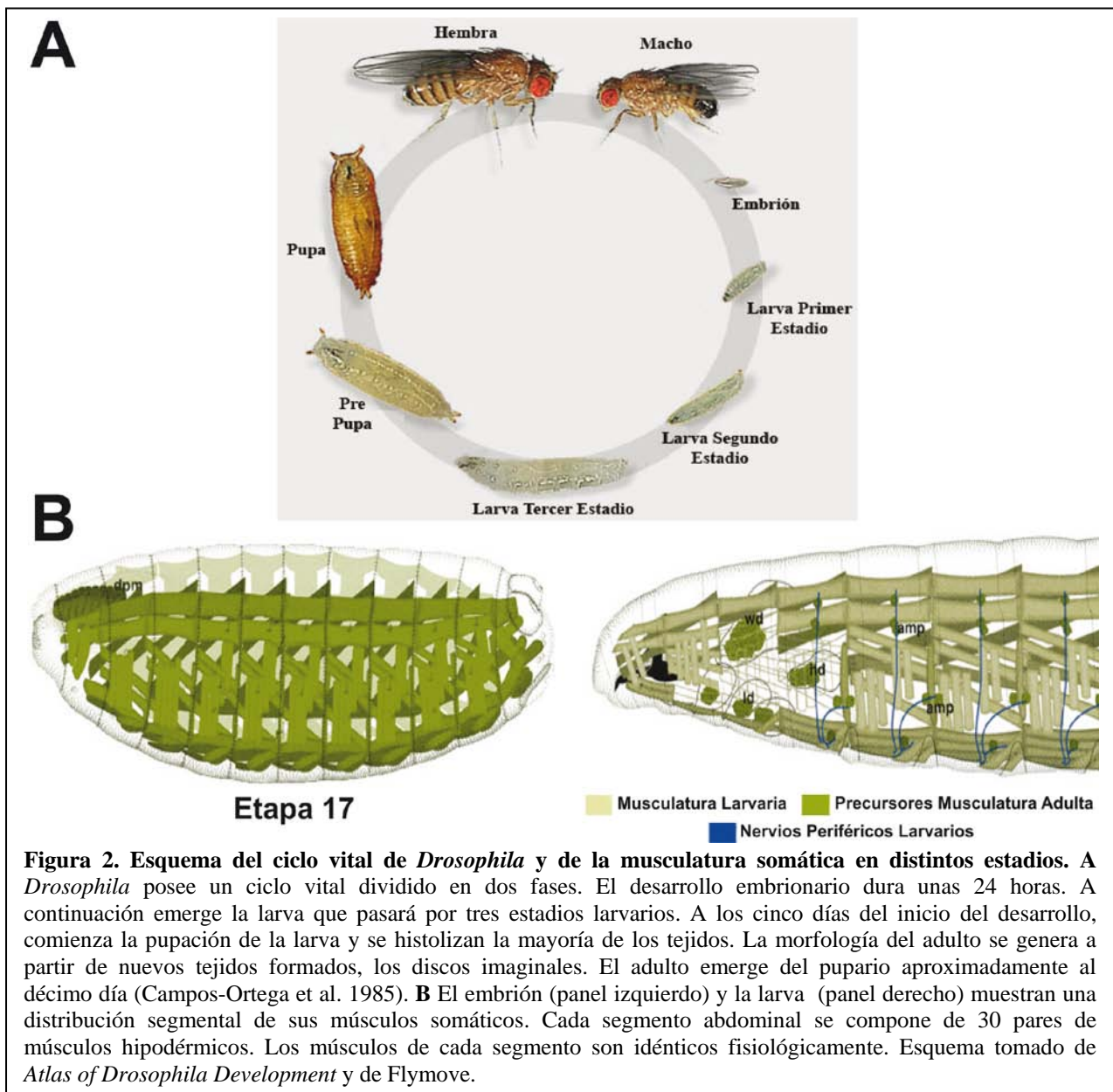


Figura 2. Esquema del ciclo vital de *Drosophila* y de la musculatura somática en distintos estadios. **A** *Drosophila* posee un ciclo vital dividido en dos fases. El desarrollo embrionario dura unas 24 horas. A continuación emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza la pupación de la larva y se histolizan la mayoría de los tejidos. La morfología del adulto se genera a partir de nuevos tejidos formados, los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente al décimo día (Campos-Ortega et al. 1985). **B** El embrión (panel izquierdo) y la larva (panel derecho) muestran una distribución segmental de sus músculos somáticos. Cada segmento abdominal se compone de 30 pares de músculos hipodérmicos. Los músculos de cada segmento son idénticos fisiológicamente. Esquema tomado de *Atlas of Drosophila Development* y de Flymove.

formen los sarcómeros en la célula muscular (Buckingham 1992; Buckingham et al. 1992).

En los últimos años, se han producido grandes avances en el conocimiento de los mecanismos de especificación de los músculos embrionarios de *Drosophila* (Maqbool et al. 2007; Richardson et al. 2008; Ciglar et al. 2009; Liu et al. 2009; Rochlin et al. 2010). La musculatura embrionaria deriva del mesodermo, que se especifica en la región ventral del embrión, cuando éste se encuentra aún en fase de blastodermo, por el gen de origen materno *dorsal* (Bate et al. 1993). Durante la gastrulación del embrión las células localizadas en la zona ventral se invaginan y migran dorsalmente (Leptin et al. 1990). Inicialmente, todas las células mesodérmicas expresan el gen *twist* (*twi*) (Thisse et al. 1988), así como sus genes diana, *tinman* (*tin*) (Bodmer 1993; Yin et al. 1997) y *Mef2* (Nguyen et al. 1994; Cripps et al. 1998). Posteriormente el mesodermo se divide en distintos dominios a partir de los cuales se diferenciarán los distintos tejidos mesodérmicos (Riechmann et al. 1997). En este proceso intervienen

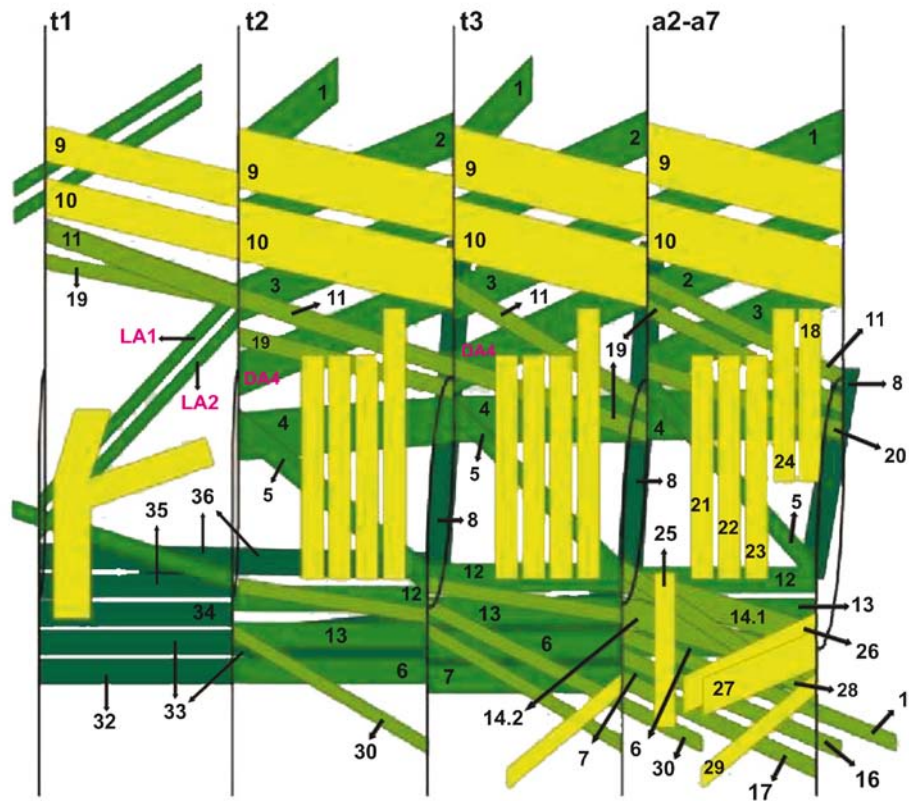
distintos genes, el gen de la familia TGF- β , *decapentaplegic (dpp)*, es el principal responsable de la división dorso-ventral del mesodermo (Frasch 1995). La división antero-posterior es conducida por dos genes de segmentación como son, *even-skipped (eve)* y *sloppy paired (slp)* (Azpiazu et al. 1996; Riechmann et al. 1997). Así, en cada segmento el mesodermo queda dividido en cuatro dominios, cada uno de los cuales da origen a diferentes tejidos mesodérmicos (Figura 4). A partir de la región dorsal se diferenciarán los músculos viscerales (zona anterior) y el corazón (zona posterior), y a partir de la región ventral los cuerpos grasos (zona anterior) y la musculatura somática (zona posterior) (Baylies et al. 1998). En esta última región se mantiene una alta expresión del gen *twi* (Baylies et al. 1996). En este contexto es importante destacar que los principales mecanismos y factores de transcripción implicados en la miogénesis están evolutivamente conservados (Bodmer et al. 1998; Olson 2006).

2.1. La formación de la musculatura somática.

La diferenciación de los músculos somáticos se produce en el mesodermo ventral posterior de cada segmento, a partir de las denominadas células progenitoras (Figura 5; Ruiz Gomez et al. 1997; Maqbool et al. 2007; Richardson et al. 2008; Ciglar et al. 2009; Rochlin et al. 2010). Estas células mantienen una alta expresión del gen *twist* y se determinan mediante un proceso de inhibición lateral mediado por factores neurogénicos de la vía de Notch (Carmena et al. 1995; Ward et al. 2000; Stute et al. 2004). Cada una de estas células progenitoras se divide asimétricamente generando o bien dos células fundadoras embrionarias (FC) o bien en una célula fundadora y una célula precursora de un músculo del adulto (Carmena et al. 1995; Ruiz Gomez et al. 1997). Esta división asimétrica depende de la distribución desigual en el progenitor en división de la proteína de señalización *numb*, una proteína transmembrana de señalización con motivo tipo dedo de Zinc (Yaich et al. 1998). Es en esta etapa cuando se establece la identidad específica de cada músculo. Cada uno de los 30 músculos somáticos presentes en cada hemisegmento se establece a partir de una única FC, que especifica las características individuales de cada músculo individual. mediante la expresión diferencial de genes en las células fundadoras. Cada FC expresa una combinación específica de genes de identidad muscular tales como *S59*, *eve*, *kruppel (kr)*, *vestigial (vg)*, *apterous (ap)* y *nautilus (nau)* (Baylies et al. 1998; Frasch et al. 1999). La combinación específica de factores de transcripción expresada en cada FC determina la morfología del músculo formado y controla el número de fusiones, la forma del músculo, la orientación, la innervación y los sitios de anclaje en la epidermis. (Rushton et al. 1995; Ruiz-Gomez 1998).

El resto de las células que mantienen una alta expresión del gen *twist* se determinan a mioblastos competentes de fusión (MCF). La fusión de estas MCFs con cada FC individual tiene como consecuencia la formación del sincitio precursor de cada músculo individual (Bate et al. 1993). En los

Organización Músculos Somáticos



Designación Músculos Somáticos			
Número	Designación	Número	Designación
1	DA1 (Dorsal Acute 1)	19	DO4 (Dorsal Oblicuo 4)
2	DA2 (Dorsal Acute 2)	20	DO5 (Dorsal Oblicuo 5)
3	DA3 (Dorsal Acute 3)	21	LT1 (Lateral Transverso 1)
4	LL1(Lateral Longitudinal 1)	22	LT2 (Lateral Transverso 2)
5	LO1(Lateral Oblicuo 1)	23	LT3 (Lateral Transverso 3)
6	VL3 (Ventral Longitudinal 3)	24	LT4 (Lateral Transverso 4)
7	VL4 (Ventral Longitudinal 4)	25	VT1 (Ventral Transverso 1)
8	SBM (Segment Border Muscle)	26	VA1 (Ventral Acute 1)
9	DO1 (Dorsal Oblicuo 1)	27	VA2 (Ventral Acute 2)
10	DO2 (Dorsal Oblicuo 2)	28	VO3 (Ventral Oblicuo 3)
11	DO3 (Dorsal Oblicuo 3)	29	VA3 (Ventral Acute 3)
12	VL1 (Ventral Longitudinal 1)	30	VO2 (Ventral Oblicuo 2)
13	VL2 (Ventral Longitudinal 2)	31	VI3 (Ventral Interno 1)
14.1	VO1 (Ventral Oblicuo 1)	32	VIS4 (Ventral Intersegmental 4)
14.2	VO2 (Ventral Oblicuo 2)	33	VIS5 (Ventral Intersegmental 5)
15	VO4 (Ventral Oblicuo 4)	34	VIS3 (Ventral Intersegmental 3)
16	VO5 (Ventral Oblicuo 5)	35	VIS2 (Ventral Intersegmental 2)
17	VO6 (Ventral Oblicuo 6)	36	VIS1 (Ventral Intersegmental 1)
18	DT1 (Dorsal Transverso 1)		

Figura 3. Organización esquemática de los músculos somáticos. Se muestran los diversos músculos presentes en hemisegmentos izquierdos embrionarios-larvarios, de exterior a interior (corresponde con intensidad de color en esquema, cuanto más oscuro sea el color, más interior se localiza el paquete muscular). La numeración de los músculos corresponde con la presentada en (Crossley 1978; Bate et al. 1993). Los músculos que solo están presentes en algún segmento específico se indican con color magenta y el nombre del músculo correspondiente. Región anterior en región izquierda y posterior en derecha. Modificado de mapa muscular disponible en Flymove.

últimos años se han descubierto un gran número de genes implicados en el proceso de fusión (Paululat et al. 1999; Paululat et al. 1999; Dworak et al. 2002; Taylor 2002; Kesper et al. 2007). Los MCFs expresan los factores de transcripción *lameduck* (*lmd*) antes de la fusión. Tras la fusión, *lmd* deja de expresarse en el núcleo de la célula y comienza a expresar los factores de transcripción que se expresan en la FC con la que se fusionó. En el proceso de fusión se requieren dos grupos de proteínas transmembrana *dumbfounded* (*duf*) y *roughest* (*rst*) en las células fundadoras y *sticks and stones* (*sns*) y *hibris* (*hbs*) en los mioblastos competentes de fusión. El sincitio precursor continua fusionándose con MCFs hasta alcanzar el número adecuado de núcleos para cada músculo individual (Rochlin et al. 2010).

En el proceso de formación de los músculos somáticos en *Drosophila*, además de Twist que es un factor esencial en definir el territorio mesodérmico, el factor de transcripción Mef2 juega un papel fundamental en la diferenciación de las células mioblásticas, en ausencia de *Mef2* no se produce la fusión y en consecuencia no se forman los músculos (ver apartado 4 de Introducción; Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994; Black et al. 1998).

La formación de los músculos somáticos del adulto se produce durante la metamorfosis. Durante la metamorfosis la mayor parte de los músculos hipodérmicos larvarios son histolizados. Sin embargo, algunos de los músculos larvarios persisten y van a ser los precursores de algunos músculos del adulto (Bate et al. 1993), como los músculos indirectos de vuelo dorso-longitudinales (IFM-DLM) o los hipodérmicos abdominales temporales. Estos músculos se desarrollan utilizando como precursores el conjunto de músculos larvarios que no fueron histolizados (Crossley 1978).

Durante la etapa larvaria un grupo de mioblastos no diferencia, prolifera, y continúa expresando *twi*. Estas células se mantienen asociadas a los discos imaginales (Ruiz Gomez et al. 1997). Por otra parte, las células precursoras que son determinadas durante la diferenciación de la musculatura somática en el embrión, sufren un proceso de duplicación y sobre la estructura resultante se fusionan los mioblastos competentes de fusión (Fernandes et al. 1991). Este proceso es dependiente de la función de *twi* que actúa a través de la activación del gen *Mef2* (Cripps et al. 1998). Los mioblastos asociados al disco imaginal de ala dan lugar a los músculos indirectos de vuelo dorso-ventrales (IFM-DVM); los situados en el disco imaginal de pata originan los músculos de salto (TDT) (Bate et al. 1991; Fernandes et al. 1991) y los situados en los de ojo-antena, cibarial y labial originan los músculos cefálicos (Raghavan et al. 1985). Un segundo grupo de músculos adultos que se forma también *de novo* es el formado por algunos de los músculos abdominales (Bate et al. 1991; Bate et al. 1991; Currie et al. 1991). En este caso, los mioblastos migran hasta la región abdominal y se fusionan entre ellos por asociación con los nervios en crecimiento para dar lugar a la fibra muscular (Currie et al. 1991).

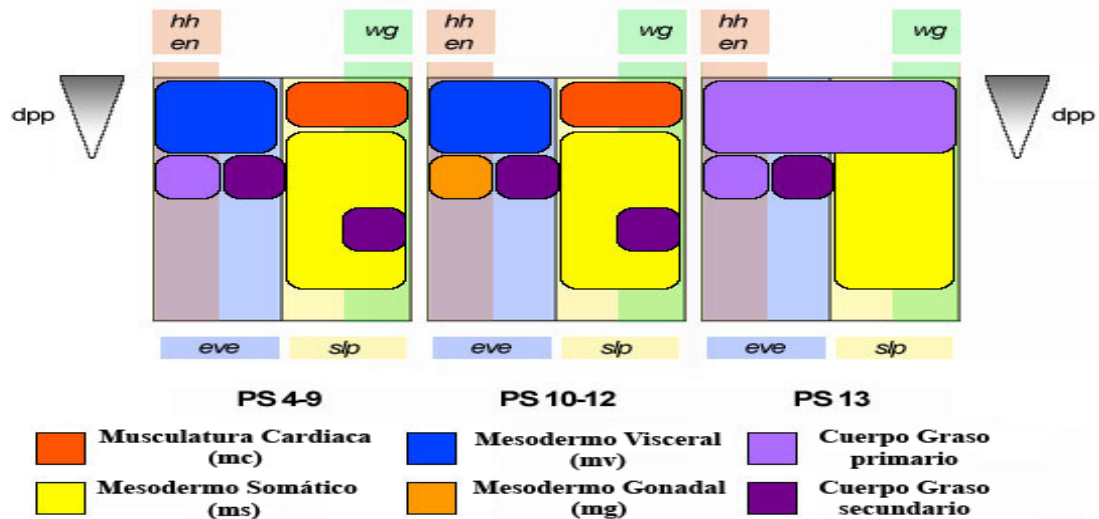


Figura 4. Subdivisión del mesodermo en *Drosophila*. Representación esquemática de las distintas señales involucradas en la subdivisión del mesodermo. Esta subdivisión se debe principalmente a la superposición de señales que se reciben del ectodermo. *decapentaplegic* (*dpp*) se expresa en niveles altos en las células ectodérmicas más dorsales y actúa sobre las células del mesodermo subyacente. El efecto inductor de *dpp* divide el mesodermo en sectores dorsal y ventral. El mesodermo se subdivide a lo largo del eje antero-posterior por los genes de segmentación *even skipped* (*eve*) y *sloppy paired* (*slp*). La combinación de estos patrones subdivide el mesodermo en 4 dominios. La agrupación de células dorsales bajo la influencia de *slp*, *wingless* (*wg*) y *dpp* generara la musculatura cardíaca (*mc*) salvo en el parasegmento 13. Las células ventrales bajo la acción de *slp* generan el mesodermo somático (*ms*) y parte del cuerpo graso. Las células mesodérmicas dorsales que reciben la señal del ectodermo de *dpp* y *hedgehog* (*hh*) en el dominio funcional de *eve* van a formar el mesodermo visceral (*mv*), mientras que las células ventrales que no reciben la señal de *dpp* van a formar el cuerpo graso (*cg*) y otros tejidos mesodérmicos. Esquema adaptado de FLYMOVE sobre (Riechmann et al. 1998).

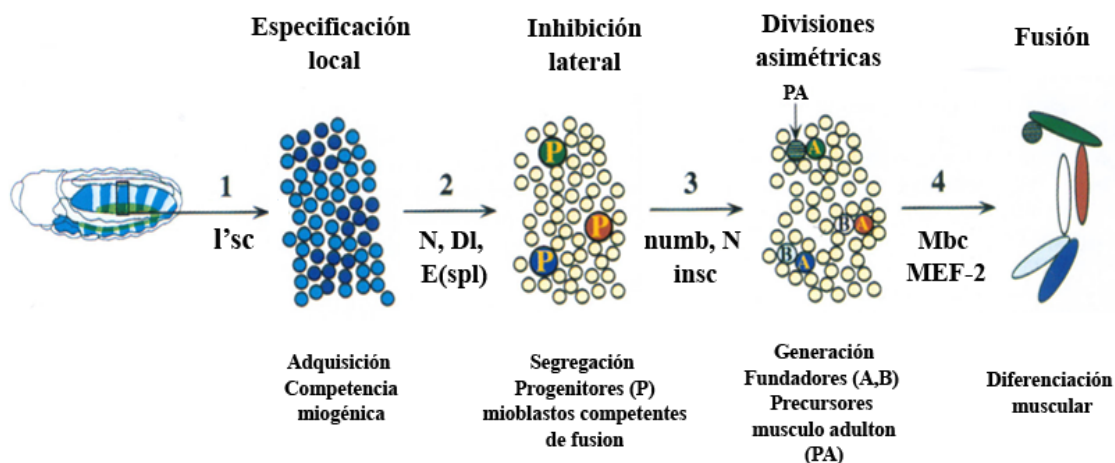


Figura 5. Formación del patrón muscular embrionario de *Drosophila*. Esquema de un embrión de estadio 10 mostrando la expresión modulada del gen *twist*. Las células que expresan *Twi* fuertemente (azul medio) van a dar lugar a todos los músculos somáticos. (1) La expresión del gen pro neural *lethalofscute* (*l'sc*) en el dominio de fuerte expresión de *Twi* marca grupos de células mesodérmicas (círculos azul oscuro) que tienen el potencial de ser progenitores musculares. (2) Mediante un proceso de inhibición lateral mediada por genes neurogénicos se restringe la expresión de *l'sc* a células individuales que se convierten en progenitores musculares (P). El resto de las células pasa a ser mioblastos competentes para la fusión. (3) La división asimétrica de los progenitores da lugar a dos células fundadoras o a una fundadora y a un precursor de músculo adulto (PA). En cualquier caso, las dos células hermanas toman diferentes destinos. (4) Cada fundador va a dar lugar a la formación de un músculo específico al fusionarse con mioblastos competentes para la fusión. Esquema tomado de Baylies et al., 1998.

2.2. El corazón de *Drosophila*: Conducto Dorsal.

Los insectos cuentan con un sistema circulatorio abierto en el que la hemolinfa fluye de forma libre por las cavidades corporales. El encargado de distribuir la hemolinfa es el conducto dorsal, que es el equivalente al corazón de mamíferos. Se trata de un tubo lineal relativamente simple que se extiende a lo largo de la línea media dorsal por debajo de la epidermis embrionaria. El conducto dorsal bombea la hemolinfa desde la región posterior a la anterior donde se libera hacia las cavidades corporales desde donde regresa al conducto. Tanto la salida como la entrada de la hemolinfa del conducto dorsal se realiza a través de unas válvulas presentes en las regiones anterior y posterior del mismo (Medioni et al. 2009).

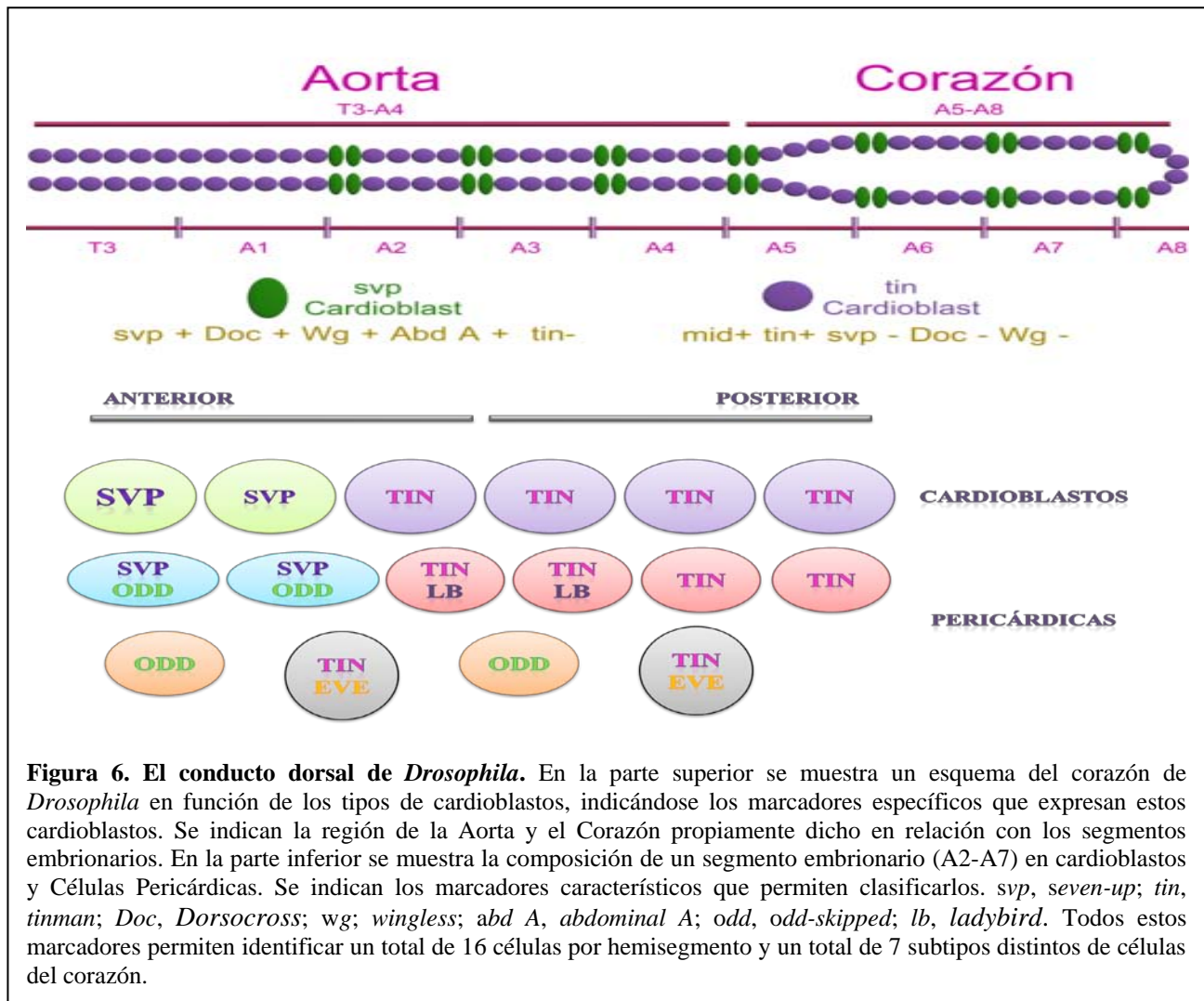
El conducto dorsal está constituido por dos tipos celulares: cardioblastos y células pericárdicas. Los primeros se alinean para formar el tubo del corazón y expresan proteínas específicas musculares que le confieren la capacidad contráctil. Las células pericárdicas no expresan proteínas musculares y se encuentran estrechamente asociadas con los cardioblastos, recubriéndolos. El papel de estas células durante el desarrollo y la función del corazón no está claro (Rizki 1978; Ward et al. 2000; Bryantsev et al. 2009).

Desde un punto de vista anatómico, el conducto dorsal se pueden dividir en 2 regiones (Figura 6):

a) El corazón propiamente dicho, se localiza en la región posterior entre los segmentos abdominales 4 y 7. Esta región cuenta con 3 pares de válvulas especializadas, denominadas ostia que se localizan en la pared lateral del corazón y que permiten la entrada de hemolinfa en el interior del corazón.

b) La aorta, es la región más anterior del conducto dorsal y tiene un menor diámetro que el corazón. Se encarga de liberar la hemolinfa en las proximidades del cerebro.

El conducto dorsal se encuentra anclado a la epidermis mediante 7 pares de músculos denominados músculos alares (“alary muscles”) y se encuentra rodeado en su región anterior por las glándulas linfáticas. La aorta atraviesa esta región y termina justo detrás de la comisura supra-esofagal, cerca del cerebro. Tanto los cardioblastos, como los músculos alares, como las células pericárdicas tienen un origen mesodérmico. La diferenciación del conducto dorsal se produce en la región dorsal posterior del mesodermo (Figura 4). En una gran variedad de organismos, tanto vertebrados como invertebrados, se ha descrito que la cardiogénesis requiere la acción de factores de transcripción de las familias de NK2, GATA y T-box (Cripps et al. 2002; Buckingham et al. 2005; Reim et al. 2005). La diferenciación de los tres grupos de células descritos: cardioblastos, células pericárdicas y músculos alares, comienza aproximadamente en la etapa 9 del desarrollo. En esta etapa el gen *tin*, el homólogo de *NK2.5* en vertebrados, se expresa en todo el mesodermo. La secreción de *wg* y *dpp* desde el ectodermo va



restringiendo el dominio de expresión de *tinman* en el mesodermo. Solo aquellas células que estuvieron expuestas a *wg* y *dpp* desde la etapa 9 a la etapa 11 continuarán expresando *tin* y se desarrollarán como precursores del conducto dorsal. En etapa 12 del desarrollo estas células se localizan en la región más dorsal del mesodermo a ambos lados del mismo. Los patrones de expresión de *tin*, *wg* y *dpp* dirigen el posicionamiento del conducto dorsal (Lockwood et al. 2002).

Hoy en día se sabe que *tinman* es un gen esencial en la formación del conducto dorsal o corazón (Azpiazu et al. 1993; Bodmer 1993) y un activador directo de *Mef2* (Gajewski et al. 1997). Embriones deficientes en *tinman* no son capaces de generar el conducto dorsal (Azpiazu et al. 1993; Bodmer 1993). También se ha demostrado que el gen *Mef2* juega un papel importante en la determinación de las células que van a dar origen al corazón del animal (Gajewski et al. 1997).

Se han identificado distintos tipos de cardioblastos y células pericárdicas en función de las combinaciones específicas de genes que expresan (Figura 6). Así, en cada hemisegmento se desarrollan seis cardioblastos. Todos ellos expresan *Mef2* y lo requieren para su diferenciación (Bour et al. 1995; Lilly et al. 1995). Por su parte *tinman* se expresa en los cuatro cardioblastos más

posteriores de cada hemi-segmento, permitiendo que estas células adquirieran un destino de miocardio funcional. El factor de transcripción *laddybird* (*lb*) se expresa en los dos cardioblastos *Tin*⁺ más posteriores (Azpiazu et al. 1993; Bodmer 1993; Jagla et al. 1997). Los dos cardioblastos más anteriores de cada hemisegmento no expresan ni *tin* ni *lb* y por lo que adoptan un destino muscular no completamente funcional. Estos cardioblastos *tin* negativos expresan *seven-up* (*svp*) desde etapas tempranas del desarrollo muscular. La presencia *svp* en estas células evita que se exprese *tin*. En los cuatro cardioblastos posteriores *Tin*man reprime la expresión de *Dorsocross* (*Doc*), quedando por tanto la expresión de *Doc* restringida únicamente a los cardioblastos más anteriores que son *Tin*-negativos. Estos cardioblastos formaran la ostia (Zaffran et al. 2006).

En las células pericárdicas la expresión de factores con motivos homeobox como *eve*, *tin*, *ladybird early* (*lbe*) y *ladybird late* (*lbl*) ha permitido identificar tres poblaciones distintas de células pericárdicas, (ver Figura 6; Frasch et al. 1987; Azpiazu et al. 1993; Bodmer 1993; Jagla et al. 1997). Dos células pericárdicas en cada hemisegmento expresan *eve* y *tin*. Estas se denominan células pericárdicas *eve* y se localizan en posición lateral y dorsal con respecto a los cardioblastos. Las cuatro células pericárdicas restantes por hemisegmento expresan *tin* y de estas, dos expresan *lbe* pero ninguna expresa *eve* (Jagla et al. 1997). Estas células se denominan células pericárdicas *Tin*⁺ y ocupan una posición ventral con respecto a los cardioblastos. Una segunda población de células pericárdicas es la definida por la expresión de *odd-skipped* (*odd*) (Ward 1997; Ward et al. 2000). La expresión de *odd* permite identificar cuatro células pericárdicas que no expresan ni *tin*, ni *eve*. Estas células pericárdicas se localizan en posición lateral y ventral respecto a la localización de los cardioblastos. Se ha demostrado que las células pericárdicas *Odd* se desarrollan a partir de tres progenitores mesodérmicos en cada hemisegmento. Dos de estos progenitores se dividen de forma asimétrica generando una célula pericárdica y un cardioblasto. Esta división asimétrica esta mediada por *numb* y *Notch* (*N*). Las otras dos células pericárdicas *Odd* se generan a partir de un único progenitor (Ward et al. 2000).

Como ya se ha comentado en el caso de la musculatura somática, diversos estudios genéticos han identificado un conjunto de genes que controlan las divisiones asimétricas de células progenitoras en diversos tipos de tejidos. Estos genes incluyen *numb*, *sanpodo* (*spd*) y miembros de la vía de señalización de Notch (Carmena et al. 1998; Dye et al. 1998; Skeath et al. 1998). La participación de estos genes en las divisiones asimétricas fue inicialmente descrita en varios trabajos realizados en el Sistema Nervioso de *Drosophila* (Skeath et al. 1998). Sin embargo, experimentos más recientes demuestran que *sanpodo*, *numb* y la vía Notch participan en las divisiones asimétricas de diversos progenitores mesodérmicos cardiacos, incluidos los que generan el linaje de células pericárdicas *eve* (Ruiz Gomez et al. 1997; Carmena et al. 1998; Park et al. 1998). Al igual que ocurría en la musculatura somática, en el desarrollo del corazón las divisiones asimétricas dependen de la

distribución desigual de *numb* entre las dos células hijas. Se ha demostrado que *numb* ejerce su acción en la célula en la que se segrega impidiendo que esta exprese componentes de la vía de señalización Notch. Las interacciones entre los genes, *numb*, *spd* y la vía Notch, permite que una única célula progenitora se divida en dos células hijas con distinto destino celular (Uemura et al. 1989; Rhyu et al. 1994; Guo et al. 1996; Spana et al. 1996; Park et al. 1998; Skeath et al. 1998). Es más, en mutantes de pérdida de función para *spd* o la vía de señalización de Notch las dos células hijas adoptan el mismo destino celular (Park et al. 1998; Ward et al. 2000). de igual forma, la deficiencia en *numb* provoca que ambas células hijas alcancen el mismo destino, sin embargo el destino elegido en este caso es el contrario al que se selecciona cuando se pierde la función de *spd* (Park et al. 1998; Ward et al. 2000).

2.3 Musculatura visceral.

En el intestino de *Drosophila* se pueden distinguir 3 zonas con distinta composición muscular. El intestino anterior, el medio y el posterior. Todos los músculos viscerales son de origen mesodérmico y los procesos de desarrollo que permiten la generación de los mismos son distintos. Actualmente no se conoce mucho acerca del desarrollo de los músculos viscerales del intestino anterior. Recientemente se ha demostrado que los músculos viscerales al igual que los músculos somáticos, se organizan en sincitio que se forman por la fusión de células individuales (Riechmann et al. 1998; Klapper et al. 2001; Martin et al. 2001; Wolfstetter et al. 2009). En el intestino medio se distinguen dos tipos distintos de músculos viscerales. Los músculos circulares, que son sincitios binucleados y los músculos longitudinales que son polinucleados (con entre 2 y 6 núcleos por músculo longitudinal). En el caso de los músculos circulares cada sincitio se establece por la fusión de una célula fundadora (que al igual que en el caso de los músculos somáticos se encarga de proporcionar la identidad específica del músculo visceral) con un mioblasto competente de fusión. En el caso de los músculos longitudinales se producen fusiones adicionales que permiten generar el sincitio polinucleado. Las poblaciones de mioblastos fundadores son distintas y se pueden diferenciar por su patrón de expresión génica en etapa 11 del desarrollo (Bate 1990; Martin et al. 2001).

A diferencia del resto de los tejidos derivados del mesodermo, los primordios de músculos longitudinales ya se encuentran determinados en la etapa de blastodermo, presumiblemente debido a la expresión de *brachyenteron* (*byn*), que es un factor de transcripción implicado en la especificación del intestino posterior y la región anal (Singer et al. 1996). Sin embargo, el proceso de formación de la fibra muscular visceral es muy similar al de los otros tipos de músculos. Al igual que ocurre en los músculos somáticos, los genes *duf* and *sns* desempeñan un papel crucial en el proceso de fusión. *Duf* se expresa en todas las células fundadoras, mientras que *sns* se expresa en los mioblastos competentes de fusión. En la etapa 12 cada fundadores, se fusiona con un mioblasto competente de fusión, generando así un sincitio binucleado. Una vez que se fusionan las dos células, la célula que expresaba

sns (el MCF) deja de expresarlo pasando ambos núcleos a expresar *duf* de forma continuada. El resto de mioblastos competentes continúan expresando *sns* continuando las fusiones hasta que los sincitios tienen entre 2 y 6 núcleos de media (Martin et al. 2001; Klapper et al. 2002).

La señalización de *dpp* desde el ectodermo induce la activación de *tin* y *bagpipe* (*bap*). La expresión de *tin* es esencial para la formación de todos los derivados viscerales del mesodermo dorsal mientras que la expresión de *bap* solo es necesaria para la especificación de los derivados mesodérmicos viscerales en las regiones bajo la acción de la expresión del gen de segmentación *eve* (Azpiazu et al. 1993; Bodmer 1993; Zaffran et al. 2001; Zaffran et al. 2002).

Análisis clonales han demostrado que la determinación de los músculos circulares del intestino medio no se produce antes de la segunda mitosis post-blastodermal, que tiene lugar durante la etapa 8 del desarrollo embrionario. Durante la etapa 10 los progenitores de los músculos circulares se encuentran asociados en racimos en la región dorsal del tronco mesodermo, entre los parasegmentos 4 y 12 (Riechmann et al. 1998). A principios de la etapa 12 coincidiendo con el acortamiento de la banda germinal, los precursores de las fibras circulares se organizan en forma de empalizada, y se fusionan para generar sincitios binucleados. Durante el cierre del intestino medio, los músculos viscerales circulares, asociados con las células endodérmicas, se estiran dorsal y ventralmente rodeando el tubo del intestino medio en desarrollo.

3. El factor de transcripción Mef2 en *Drosophila*.

La proteína Mef2 pertenece a la familia de factores de transcripción tipo MADS. La organización de esta familia de proteínas es muy similar. En el extremo N-terminal se sitúan los dominios más conservados evolutivamente, el dominio de unión a DNA tipo MADS y el dominio tipo Mef2. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de transactivación. Los factores de transcripción Mef2 tienen la capacidad de homo y heterodimerizar a través del dominio MADS. Este es, además, un dominio de unión a DNA de baja afinidad y precisa de la presencia del dominio adyacente, el dominio Mef2, tanto para la unión de alta afinidad con el DNA como para la dimerización (Molkentin et al. 1996).

En vertebrados, donde fue descrito inicialmente, *Mef2* forma parte de una familia de factores de transcripción formada por cuatro genes, *Mef2A*, *B*, *C* y *D*, y que juegan un papel esencial en la formación del músculo (Gossett et al. 1989). En *Drosophila*, la proteína Mef2 es codificada por un único gen que produce diversas isoformas que, a su vez, pueden presentar diferentes modificaciones post-transcripcionales. Los primeros datos de expresión de este factor de transcripción en *Drosophila* indican que Mef2 se expresa en todas las células musculares desde la gastrulación (3-4 horas) hasta el final de la embriogénesis (Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994; Black et al. 1998). Inicia su expresión

con el comienzo de la especificación muscular, manteniéndola a lo largo de toda la diferenciación muscular. Mef2 se expresa esencialmente en todas las células que van a dar lugar a la formación de las estructuras musculares ya sean somáticas, viscerales o cardíacas (Taylor et al. 1995; Mantrova et al. 1999).

Mef2 juega un papel fundamental en la adquisición del fenotipo muscular en *Drosophila* y vertebrados (Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994; Black et al. 1998). En vertebrados, Mef2 es esencial para la diferenciación del músculo, aunque no es capaz de activar por sí mismo el programa miogénico en células en cultivo de tejidos no diferenciados (Molkentin et al. 1996). Estos resultados sugirieron que Mef2 debía actuar con co-factores específicos para controlar la miogénesis y permitir la adquisición y mantenimiento de un destino muscular. La eliminación del gen en *Drosophila* provoca que, las células no adquieran el fenotipo mioblastoide y por tanto no formen ningún tipo de músculo en el embrión aun a pesar de que los precursores de células fundadoras se posicionen correctamente (Lilly et al. 1995; Ranganayakulu et al. 1995). Más aún, la falta de proteína *Mef2* impide el proceso de fusión de los mioblastos durante la miogénesis. Se produce una ausencia total de proteínas contráctiles indicando que, en esta etapa, Mef2 juega un importante papel. Los mutantes de Mef2 expresan marcadores mesodérmicos como *eve*, que se expresa en los precursores de un músculo somático y en varias células pericárdicas. En los mutantes de Mef2, el número de células pericárdicas Eve+ no varía (Bour et al. 1995). Como ya se ha mencionado, los mioblastos en estos mutantes no son capaces de fusionarse aunque si son capaces de atraer hacia si las inervaciones nerviosas. Además, en estos mutantes las células precursoras musculares entran en apoptosis (Bour et al. 1995). En este mismo contexto, se ha demostrado que la expresión ectópica de la proteína Mef2 en la epidermis del embrión induce la expresión de genes específicos musculares (Lin et al. 1997). Todos estos hechos demuestran la importancia de Mef2 en la diferenciación muscular.

A pesar de los abundantes datos disponibles a cerca de la función de Mef2, es poco lo que se conoce acerca del mecanismo de activación de este factor. En vertebrados y mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que la activación de al menos una parte de sus genes diana se produce a través de la interacción directa de Mef2 con los miembros de la familia de factores de transcripción miogénicos b-HLH (Myf5; MyoD; MRF4 y miogenina). Además, estos trabajos han permitido identificar la secuencia consenso CTAAATATG, presente en muchos genes musculares, como la reconocida por Mef2 (Buckingham 1994; Olson et al. 1994). Esta activación Mef2/MyoD da lugar a la activación de los genes sarcoméricos, la unión al “enhancer” se realizará vía Mef2, MyoD/Myf5 o a través de la acción conjunta de ambos factores. Por otra parte, en ratón, los análisis genéticos indican que Myf5, MyoD y MRF4 realizan un papel parcialmente solapante y redundante en la especificación muscular. En cambio, los mutantes triples no producen músculo (Kassar-Duchossoy et al. 2004). En otros tipos

de músculo, cardíaco o visceral, se conoce poco de cuáles son los co-factores que acompañan a Mef2 haciendo un papel equivalente a MyoD en músculo somático.

La situación en *Drosophila* es diferente. Se ha identificado un solo homólogo de MyoD, *nautilus*, que no realiza una función equivalente a realizado por los miembros de esta familia en vertebrados y que, a diferencia de la familia MyoD que se expresa en todos los músculos somáticos, se expresa exclusivamente en un grupo de estos músculo. El gen *nau* no es esencial para el desarrollo general del sistema muscular (Abmayr et al. 1998; Keller et al. 1998). Mef2 se expresa antes que *nau*, expresándose tanto en los precursores de músculo esquelético como en los de músculo cardíaco, mientras que *nau* solo se expresa en algunos precursores de músculos somáticos (Abmayr et al. 1998; Keller et al. 1998). En los mutantes de *Mef2*, *nau* se expresa con normalidad en las células adecuadas pero estas no llegan a formar el sincitio multi-nucleado necesario para la formación de las fibras musculares.

En *Drosophila*, el promotor del gen *Mef2* ha sido ampliamente estudiado (Nguyen et al. 1998; Cripps et al. 1999; Potthoff et al. 2007). Se han identificado de diferentes “enhancers” en la región 5’ del gen que permiten una expresión diferencial de *Mef2* durante el desarrollo (Nguyen et al. 1998). Los productos de diferentes genes participan en la regulación de la expresión de *Mef2* en distintas etapas y en distintos dominios mesodérmicos. Entre los reguladores descritos se encuentra el factor de transcripción *twi*, que es capaz de inducir la expresión ubicua de *Mef2* en el mesodermo (Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994; Taylor et al. 1995). De igual forma, en el tejido muscular cardíaco el factor de transcripción *tin* es capaz de modular la expresión de Mef2 a lo largo del desarrollo en el sistema cardíaco en *Drosophila* (Gajewski et al. 1997).

Usando una combinación de ensayos de “ChIP-on-chip”, ensayos de microarrays de expresión y estudios con mutantes de pérdida de función el grupo de E. Furlong (Sandmann et al. 2006) ha sugerido que Mef2 actúa a lo largo de todo el proceso de la diferenciación muscular, desde la especificación hasta la diferenciación terminal. Mef2 activa diferencialmente tres grupos diferentes de genes. En las etapas más tempranas (4-6 horas) participa en la subdivisión del mesodermo dorsal activando a genes importantes para la especificación del territorio visceral (*bap*, *slp1* o *HLH54F*) o cardíaco (*nmr1*, *zfh1*, *u-shaped* (*ush*)); posteriormente (6-8 horas) regula genes que dan identidad a las células fundadores (*tin*, *muscleblind* (*mbd*), *lmd*...) y finalmente a las 8-9 horas activa los genes de diferenciación muscular (*MyHC*, *mlc1*, *mlhII*, *tmlI*, *tmlII*, *pm*, *Act57B*, *b-3tub60D*, *mlp60A*, *mlp84b*, *mp20*, *mbl*...) necesarios para la formación de las fibras musculares. Además estos datos indican que aunque Mef2 se expresa ampliamente a lo largo del desarrollo muscular, su capacidad de unirse a DNA esta temporalmente regulada dependiendo posiblemente del contexto del “enhancer”. Por otra parte, los niveles expresión de proteína Mef2 son especialmente importantes, algunos genes-diana se

activan a bajas concentraciones del factor y otros a altas concentraciones, lo que añade un nivel de complejidad más a la hora de estudiar la función de este factor de transcripción (Elgar et al. 2008).

Como ya se ha mencionado, a diferencia de vertebrados, en *Drosophila* no se conocen proteínas que interaccionen con Mef2. Un posible candidato a actuar con Mef2 en podría ser *twi*. El gen *twi* se expresa en todo el territorio mesodérmico, pertenece a la familia de factores b-HLH y es esencial para el desarrollo temprano del mesodermo embrionario de *Drosophila* (Dohrmann et al. 1990; Michelson et al. 1990; Furlong et al. 2001). Además, la expresión inicial de *Twist* coincide con la de *Mef2* (Taylor et al. 1995; Cripps et al. 1998), y se ha demostrado que mutantes con bajos niveles de *Twist* no producen músculo como sucede en vertebrados en el triple mutante de *MyoD*, *Myf5* y *MRF4* en vertebrados (Anant et al. 1998; Cripps et al. 1998; Valdez et al. 2000). Al igual que *MyoD* o *Myf5*, *twi* es un activador de *Mef2* y se expresa antes que este (Gajewski et al. 1998). Estos datos podrían sugerir que *twi* podría ser uno de los co-factores que realice un papel equivalente al desempeñado por familia *MyoD* en vertebrados, durante primera etapa de actuación de *Mef2*. Sin embargo, el patrón de expresión de *twi* es transitorio, su expresión se inicia durante la especificación del mesodermo (2.5-3 horas), posteriormente en la etapa 11 del desarrollo (6 a 7 h) presenta un pico de expresión para, más tarde, reducir su expresión drásticamente (Bate et al. 1991). Durante el segundo periodo de actuación de *Mef2*, la expresión de *twi* y *nau* no coincide totalmente con la expresión de *Mef2* (Sandmann et al. 2006). Finalmente, *twist* no se expresa en los precursores de músculo somático pero si en los cardiacos (Nguyen et al. 1994). Estos datos, aunque no descartan que *Twist* pueda interaccionar con *Mef2*, sugieren que ha de haber otros factores implicados en el proceso de diferenciación que colaboren con *Mef2*.

Otros posibles candidatos menos estudiados podrían ser las proteínas con dominio tipo SAP como la Miocardina y MASTR que son capaces de estimular la actividad transcripcional de *Mef2* en músculo cardíaco y esquelético respectivamente (Molkentin et al. 1995; Naidu et al. 1995; Molkentin et al. 1996; Creemers et al. 2006; Creemers et al. 2006). *Mef2* también interacciona con factores de transcripción generales, como el co-activador p300 y los miembros de la familia de las histonas deacetilasas (Tanaka et al. 2008). Factores como *hand*, *mbd*, *lmd* y *Cf2*, entre otros, también se han relacionado con *Mef2* y con el programa miogénico (Artero et al. 1998; Taylor 2000; Duan et al. 2001; García-Zaragoza et al. 2008; Tanaka et al. 2008).

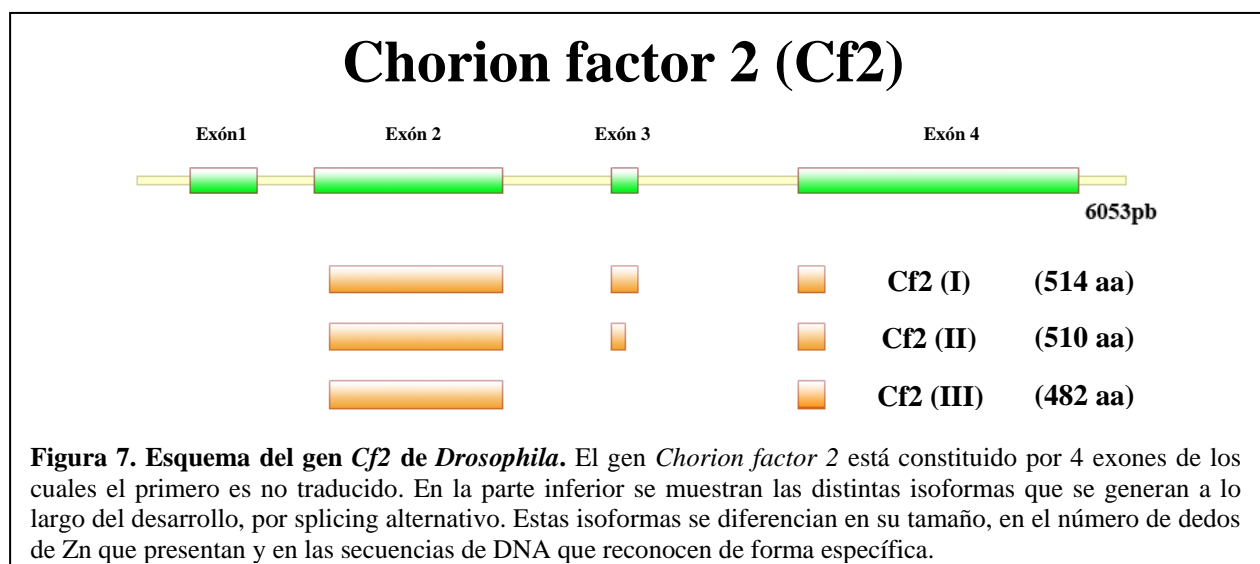
En etapas posteriores del desarrollo muscular otros factores de transcripción colaborarían con *Mef2*, aunque hasta el momento no se conocen. El grupo de E. Furlong ha identificado más de 200 genes diana directos para *Mef2* en *Drosophila*. Estos genes diana de *Mef2* muestran patrones de expresión espacio-temporal diferentes, lo que sugiere que deben existir mecanismos de control reguladores adicionales, además de *Mef2* (Sandmann et al. 2006). Entre estos genes diana podrían encontrarse los

co-factores de Mef2. Aunque Mef2 se expresa en todo el linaje muscular, algunos de su genes diana se expresan exclusivamente en subgrupos específicos de células, sugiriendo la participación de más factores bien que actúen a nivel de “enhancers” específicos diferentes a aquellos con los que interacciona Mef2 bien otros co-factores que interaccionen directamente con Mef2 o los “enhancers” con los que interactúa.

La búsqueda de co-factores adicionales capaces de colaborar con Mef2 en la activación diferencial de los genes diana sarcoméricos ha sido un área de interés en los últimos años. Uno de estos co-factores podría ser Cf2. El gen *Cf2* comparte el patrón de expresión de *mef2*, si bien su expresión empieza un poco más tarde (Bagni et al. 2002). Diversos estudios han demostrado la importancia de la acción conjunta de Mef2 y Cf2 para la consecución de los niveles adecuados de proteínas musculares en cada etapa (García-Zaragoza et al. 2008; Tanaka et al. 2008). Por último, recientemente nuestro laboratorio ha demostrado que Mef2 y Cf2 son capaces de interaccionar físicamente, al menos *in vitro*, si bien esta interacción es débil (García-Zaragoza et al. 2008).

4. El factor de transcripción Cf2 en *Drosophila melanogaster*.

El gen *Chorion factor 2* se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 2 en la banda 25B1 de *Drosophila* y ocupa 6,1 kb. Hasta el momento no se ha identificado un homólogo en vertebrados. Este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción con dedos de Zn del tipo Cys2-His2 que reconocen por afinidad secuencias ricas en A+T (Figura 7; Shea et al. 1990; Gogos et al. 1992; Hsu et al. 1992). Este gen expresa tres isoformas diferentes que se producen por procesamiento alternativo. Las tres isoformas se diferencian en el número total de dedos de Zn, que varía entre 6 y 7 en el tamaño de las proteínas que codifican Cf2 I (514aa), Cf2 II (510aa) y Cf2 III (482aa). Las isoformas mayoritarias a lo largo del desarrollo son Cf2 I en adultos y Cf2 II en embriones, estando presentes ambas isoformas en estadio de pupa (Hsu et al. 1992). La isoforma Cf2 III es específica del testículo. En el extremo amino terminal de las tres isoformas se sitúan 3 dedos de zinc, los dos primeros no se unen directamente al DNA y parece que ayudan a la unión al DNA del otro dedo de cinc estabilizando la estructura del DNA (Gogos et al. 1992; Hsu et al. 1992). En la región carboxi-terminal, Cf2-I y Cf2-II cuentan con 4 y 3 dedos de Zinc adicionales. Las dos isoformas adquieren una configuración diferente en esta región como consecuencia del distinto procesamiento del intrón 3, lo que permite que estas dos isoformas se unan a distintas secuencias de DNA (Hsu et al. 1992). Cada dedo de Zn de la región carboxilo terminal reconoce específicamente un triplete de nucleótidos de forma anti-paralela, haciendo que la isoforma Cf2 I, que cuenta con 4 dedos de Zinc en esta región, reconozca la secuencia consenso de 12 bases GTATATTATATA. Mientras que la isoforma Cf2 II, que solo cuenta con 3 reconoce la secuencia consenso GTATATATA, de 9 residuos. El reconocimiento de diferentes secuencias consenso sugiere que estas dos isoformas partici-



pan en la regulación de distintos genes o que se unen con distinta afinidad al DNA, regulando así los niveles de expresión (Gogos et al. 1992). En el año 1995 se identificaron las primeras secuencias de alta afinidad de unión a Cf2 en un gen muscular: el intrón 1 del gen de la *tropomiosina 1* (*tm1*) (Hsu et al. 1996). Posteriormente se han descrito sitios de unión a DNA en la mayoría de los genes musculares (García-Zaragoza et al. 2008).

Cf2 fue identificado por su implicación en el establecimiento del patrón dorso-ventral durante la ovogénesis de *Drosophila*. En la ovogénesis, Cf2 está implicado en la vía de transducción de señales GRK-EGF R en las células del folículo (Hsu et al. 1996). Cf2 actúa en este caso como represor de diversos genes de expresión dorsal. Tanto la expresión ectópica como la eliminación de Cf2 alteran la polaridad dorso-ventral de la cámara del oocito (Mantrova et al. 1998). Sin embargo, los estudios funcionales más relevantes se han realizado en músculo y hoy se conoce que realiza un papel esencial en este tejido. Cf2 es un marcador miogénico que se expresa en los tres linajes musculares en todos los músculos en desarrollo del embrión (Bagni et al. 2002).

La expresión de Cf2 se detecta inicialmente en el mesodermo somático y visceral, al comienzo de la etapa 11 (7h) tras el retroceso de la banda germinal, coincidiendo con la fusión de los mioblastos. En la etapa 13 las proteínas Cf2 II y Mef2 se detectan en todas las células de músculo esquelético. En etapas posteriores, Cf2 II se expresa en todos los linajes musculares si bien tras la etapa 16 su expresión comienza a decaer en músculos viscerales. Cf2 no se detecta en el corazón antes de la etapa 13, a pesar de que los progenitores cardíacos ya se encuentran especificados desde la etapa 11 tras el retroceso de la banda germinal. En etapa 14 se detectan altos niveles de expresión en el conducto dorsal y se mantienen elevados a lo largo de todo el desarrollo del corazón. No ha descrita expresión de Cf2 en células pericárdicas (Bagni et al. 2002). En la etapa larvaria se detecta principalmente el RNA de Cf2 II, sin embargo en pupas se detectan las isoformas I y III, siendo mayoritaria la primera

de ellas (Hsu et al. 1992). La expresión de Cf2 durante el desarrollo es equivalente a la de Mef2 en lo que a los linajes musculares se refiere, si bien parece que la expresión de Mef2 comienza un poco antes que la de Cf2. De hecho Cf2 no se detecta en etapa 11 mientras que en este momento Mef2 ya aparece en musculatura somática y visceral. En etapas posteriores ambas proteínas comparten un mismo patrón de expresión (Bagni et al. 2002).

Hasta el momento existe bastante controversia acerca de cuál es la jerarquía genética de Mef2 y Cf2. Los análisis epistáticos realizados hasta el momento sugieren que la expresión de Cf2 es dependiente del factor miogénico Mef2 (Bagni et al. 2002). Experimentos realizados con líneas deficientes para Mef2 y Cf2 parecen sugerir que en la cascada génica el factor Cf2 es posterior a Mef2 en la jerarquía de factores miogénicos. En la línea mutante *D-Mef2²²⁻²¹*, deficiente para Mef2, no se forman músculos aunque sí que aparecen los precursores musculares. En estos mutantes no es posible detectar expresión Cf2 en ningún linaje muscular. Por el contrario, en la línea *Df2^{γ27}*, en la que se ha eliminado el locus *Cf2* (eliminando una región de unos 20Kb del cromosoma 2L) se sigue detectando expresión de Mef2. Estos resultados indican que en ausencia de Cf2 la expresión de Mef2 puede darse con independencia de Cf2 (Hsu et al. 1996; Bagni et al. 2002). En cuanto a la relación funcional entre Mef2 y Cf2, se ha demostrado mediante estudios de transfección en cultivos celulares que tanto Mef2 como Cf2 son capaces de activar la transcripción de forma individual pero que ambos actúan sinérgicamente en la activación de la transcripción para mantener los niveles de transcripción altos. En el gen de la *Actina57B* (*Act57B*) se han identificado regiones de activación de la expresión que requieren de ambos factores, Mef2 y Cf2, para alcanzar los niveles de expresión adecuados. Ambos factores son capaces de activar la expresión de *Act57B* de forma individual tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo solo la acción conjunta de ambos factores permite alcanzar altos niveles de expresión (Tanaka et al. 2008).

Por otra parte, estudios realizados en nuestro laboratorio sobre mutantes hipomorfos de *Cf2* demuestran que la reducción de Cf2 altera la expresión de diferentes genes musculares, afectando a la expresión relativa, y por tanto a la estequiometría, de los componentes del filamento grueso y fino. En estos mutantes se aprecia, en las distintas etapas del desarrollo analizadas, una reducción en la expresión de los genes de filamento delgado que se acompañaba de un aumento en la transcripción de genes del filamento grueso. Este efecto se veía agravado con la edad. Estos resultados demostraron que la disminución acusada de los niveles de Cf2 altera la expresión de los componentes de los filamentos fino y grueso a través de un mecanismo desconocido, afectando a la estequiometría de las proteínas sarcoméricas y, en consecuencia, al ensamblaje y funcionalidad de la miofibrilla (García-Zaragoza et al. 2008). Estudios previos ya habían demostrado que el factor de transcripción Mef2 es esencial para la activación de genes musculares en esta etapa de la diferenciación muscular (Ranganayakulu et al.

1995; Lin et al. 1996; Arredondo et al. 2001; Kelly et al. 2002; Marín et al. 2004; García-Zaragoza et al. 2008). Por otra parte, como ya se ha mencionado, nuestro grupo ha demostrado mediante experimentos de GST “pull-down” que Cf2 es capaz de interaccionar *in vitro* con Mef2 si bien esta interacción es débil (García-Zaragoza et al. 2008). En un estudio de los “enhancers” de genes musculares sarcoméricos co-regulados identificados en nuestro laboratorio se ha demostrado que estos cuentan con agrupaciones de sitios de unión para Mef2 y Cf2 en regiones de aproximadamente 500pb. En el laboratorio se ha hipotetizado que, para asegurar la producción de la cantidad correcta de proteína en cada tipo de fibra, estos elementos discretos interaccionan entre sí través de complejos multi-proteicos que contendrían, entre otros factores, Mef2 y Cf2. Este tipo de agrupaciones se ha encontrado en los “enhancers” de genes que codifican componentes tanto del filamento fino como del grueso (*tnT*, *tnI*, *Tm1*, *Tm2*, *MyHC* o *Pm*) (García-Zaragoza et al. 2008). Más aún, en el laboratorio se realizó un estudio de 1015 regiones genómicas que unen Mef2 *in vivo* y que fueron identificados por el grupo de E. Furlong (Sandmann et al. 2006). El análisis de estos fragmentos permitió determinar que un 15,3% de los sitios Mef2 identificados cuentan con un sitio de unión para Cf2 a menos de 200pb, lo que supone una frecuencia 9 veces mayor a la que cabría esperar en una distribución al azar. La elevada frecuencia con que aparecen estas agrupaciones aparezcan sugiere que han de ser importantes para la regulación de genes musculares de expresión general (García-Zaragoza et al. 2008).

En resumen, análisis genéticos, funcionales e *in silico* sugieren que Cf2 es un buen candidato para colaborar con complejos que contienen Mef2, en el mantenimiento de la transcripción de genes específicos del músculo.

Objetivos

Objetivos

Nuestro grupo en los últimos años se ha centrado en el análisis de la regulación transcripcional a nivel muscular y en el estudio de su implicación en el proceso miogénico, en diferentes modelos animales (inicialmente con *Drosophila* y más recientemente con el modelo de ratón). Estudios previos identificaron el factor de transcripción Chorion factor 2 (Cf2) como una proteína esencial para el establecimiento del patrón dorso-ventral durante la ovogénesis en *Drosophila*. Posteriormente se ha demostrado la importancia de este factor como regulador miogénico en la diferenciación muscular.

En este trabajo hemos tratado de profundizar en el conocimiento de la implicación del factor de transcripción Cf2 en el desarrollo y mantenimiento del sistema muscular de *Drosophila*, para lo que nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Producción de anticuerpos policlonales contra los factores de transcripción Cf2 y Mef2. El objetivo era generar así herramientas específicas que nos permitiesen analizar su expresión y seguir de forma inequívoca la población de células musculares a lo largo del desarrollo embrionario.

2.- Análisis fenotípico en embriones y larvas del efecto de la reducción temprana de los niveles de Cf2, mediante microinyección directa en embriones de dsRNAi.

3.- Estudio de la función de Cf2 en el desarrollo embrionario muscular, usando para ello líneas deficientes o líneas transgénicas que expresan distintos niveles de Cf2, sobre-expresión, silenciamiento. Prestando especial atención a su posible relación con otros factores implicados en el desarrollo, mantenimiento o función de los linajes musculares somático y cardíaco.

4.- Caracterización funcional de la relación entre los factores miogénicos Cf2 y Mef2 en el desarrollo embrionario de los linajes musculares somático y cardíaco.

Materiales y Métodos

MATERIALES

Todos los reactivos empleados en la preparación de las distintas soluciones y tampones han sido de grado analítico o de grado apto para su uso en biología molecular.

1. Líneas de *Drosophila melanogaster*.

Las moscas se cultivaron en un medio compuesto de 10% de levadura, 7,5% de azúcar, 3,5% de harina de trigo, utilizando 0,6 % de ácido propiónico como antimicótico y 1,25% de agar.

De forma general en los estudios realizados en esta tesis las moscas se crecieron en una cámara de 25° C de temperatura y un 60% de humedad relativa, bajo un ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad.

1.1. Líneas de *Drosophila melanogaster* empleadas.

Las líneas de *Drosophila melanogaster* que se han usado en el desarrollo de esta tesis se describen a continuación (Tablas I a IV).

Tabla I. Líneas control y balanceadoras.

Nombre	Genotipo	Origen	Observaciones
yellow white	y, w;;	M. Cervera	Parental de las líneas transgénicas
Doble balanceada y doble marcada	y, w; <i>If/CyO</i> ; <i>MKRS/Tm6,Tb</i>	M. Cervera	Mapeo y estabilización de líneas letales
<i>CyOGFPTm3SerGFP</i>	w;sp/ <i>CyOActGFP</i> ;830/ <i>Tm3,Ser Act5C GFP</i>	J. J. Arredondo	Marcaje Fluorescente líneas en estudio
MHC GFP	y, w;; <i>MyHC GFP</i>	M. Ruiz Gómez	Expresión GFP en sistema muscular

Tabla II. Líneas Deficientes.

Nombre	Genotipo	Origen	Observaciones
<i>Df2γ²⁷</i>	y, w ; <i>Df2γ²⁷/CyO</i> ; +	R.Cripps	Deficiente en <i>Cf2</i>
<i>mef2³⁰⁻⁵</i>	y,w; <i>Df2/CyOkrGal4UASGFP</i> ;	R.Cripps	Deficiente en <i>Mef2</i>

Tabla III. Líneas trans activadoras Gal4.

Nombre	Genotipo	Origen	Observaciones
<i>Mef2-Gal4</i>	y, w;; <i>Mef2-Gal4</i>	M. Ruiz Gómez	Activador muscular
<i>twi twi- Gal4</i>	<i>twi-Gal4;twiGal4</i> ;	M. Ruiz Gómez	Activador muscular
<i>Mef2-Gal4/Tm6,Tb</i>	y, w; <i>If/CyO</i> ; <i>Mef2-Gal4/ Tm6,Tb</i>	M. Cervera	Activador muscular
<i>twi twi-Gal4;Tm6,Tb/MKRS</i>	<i>twiGal4;twiGal4;MKRS/ Tm6,Tb</i>	M. Cervera	Activador muscular

Tabla IV. Líneas efectoras UAS.

Nombre	Genotipo	Observaciones
UAS <i>Cf2s</i> 86	y, w, P{UAS <i>Cf2</i> };;	Generada en este trabajo

Nombre	Genotipo	Observaciones
UAS <i>Cf2s</i> 86 DBDM	y, w, P{UAS <i>Cf2</i> };If/CyO;MKRS/ <i>Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2s</i> 71	y, w;;P{UAS <i>Cf2</i> }	Generada en este trabajo
<i>CyO/If</i> UAS <i>Cf2s</i> 71	y, w;If/CyO;P{UAS <i>Cf2</i> }	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2i</i> 5	y, w;; P{UAS RNAi <i>Cf2</i> }	Generada en este trabajo
<i>CyO/If</i> UAS <i>Cf2i</i> 5	y, w;If/CyO;P{ UAS RNAi <i>Cf2</i> }	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2i</i> 12	P{UAS RNAi <i>Cf2</i> };;	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2i</i> 12 DBDM	y, w, P{UAS RNAi <i>Cf2</i> };If/CyO;MKRS/ <i>Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2s</i> 86; <i>Mef2-Gal4/Tm6,Tb</i>	y, w, P{UAS <i>Cf2</i> };; <i>Mef2-Gal4/Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2s</i> 86; <i>Mef2-Gal4/Tm3,SerGFP</i>	y, w, P{UAS <i>Cf2</i> };; <i>Mef2-Gal4/Tm3,SerActGFP</i>	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2i</i> 12; <i>Mef2-Gal4/Tm6,Tb</i>	y, w, P{UAS RNAi <i>Cf2</i> };; <i>Mef2-Gal4/Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
UAS <i>Cf2i</i> 12; <i>Mef2-Gal4/Tm3,SerGFP</i>	P{UAS RNAi <i>Cf2</i> };; <i>Mef2-Gal4/Tm3,SerActGFP</i>	Generada en este trabajo
<i>twi-Gal4;twi-Gal4</i> ; UAS <i>Cf2s</i> 71/ <i>Tm6,Tb</i>	y, w, <i>twi-Gal4; twi-Gal4</i> ; P{UAS <i>Cf2</i> }/ <i>Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
<i>twi-Gal4;twi-Gal4</i> ; UAS <i>Cf2s</i> 71/ <i>Tm3,SerGFP</i>	y, w, <i>twi-Gal4; twi-Gal4</i> ; P{UAS <i>Cf2</i> }/ <i>Tm3,SerActGFP</i>	Generada en este trabajo
<i>twi-Gal4;twi-Gal4</i> ; UAS <i>Cf2i</i> 5/ <i>Tm6,Tb</i>	y, w, <i>twi-Gal4; twi-Gal4</i> ; P{UAS RNAi <i>Cf2</i> }/ <i>Tm6,Tb</i>	Generada en este trabajo
<i>twi-Gal4;twi-Gal4</i> ; UAS <i>Cf2i</i> 5/ <i>Tm3,SerGFP</i>	y, w, <i>twi-Gal4; twi-Gal4</i> ; P{UAS RNAi <i>Cf2</i> }/ <i>Tm3,SerActGFP</i>	Generada en este trabajo

2

2. Cepas bacterianas.

Para la transformación y crecimiento de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli DH5α*.

Para la expresión de proteínas recombinantes se empleo la cepa BL21(DE3) de *E. coli* aptas para la expresión inducida por IPTG.

Los genotipos de ambas cepas se han descrito previamente (Sambrook et al. 1989).

3. Plásmidos.

3.1. Vectores bacterianos.

- **pGEM-Teasy** (Promega). Vector utilizado en el clonaje y secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR. También se empleo en reacciones de transcripción *in vitro* para generar RNA interferentes de doble cadena que se emplearon para estudiar el efecto de la interferencia temprana de *Cf2* por microinyección directa en embriones de *D. melanogaster*

- **pRSET B** (Invitrogen). Vector de expresión que permite obtener niveles altos de expresión de proteínas recombinantes. Cuenta con un promotor inducible T7 que se activa en respuesta a la presencia en el medio de IPTG. Las proteínas recombinantes expresadas con este vector cuentan

con una cola de Histidinas en el extremo amino terminal, lo que facilita la posterior recuperación y purificación de la proteína expresada. Se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes empleadas en la generación de anticuerpos contra Cf2 y Mef2.

3.2. Vectores de expresión en *D. melanogaster*.

- **pUAST**. Utilizado en la transformación de *Drosophila* para el análisis *in vivo* de los efectos de la sobre-expresión o silenciamiento de Cf2, previamente descrito (Brand et al. 1993).
- **pUChsIIΔ2-3**. Plásmido que aporta la expresión de la enzima transposasa en la generación de moscas transgénicas por transposición de elementos P. Se co-inyecta en embriones de *Drosophila* junto a las construcciones realizadas en vectores derivados de elementos P (Laski et al. 1986).

3.3. Construcciones.

Las siguientes construcciones fueron diseñadas y preparadas en el presente trabajo:

pGEM-Teasy dsRNAi e2. Contiene una copia del primer exón traducido del cDNA de Cf2 de *D. melanogaster*, flanqueada en cada extremo por un promotor T7 que nos permiten transcribir ambas cadenas de DNA. Con este vector se generó el dsRNAi contra el exón 2 de Cf2 que se empleó para el análisis del efecto temprano del silenciamiento de Cf2.

pGEM-Teasy dsRNAi e3e4. Plásmido generado en el laboratorio a partir del vector pGEMTeasy. Contiene una copia de los exones 3 y 4 del cDNA de Cf2 de *D. melanogaster*, flanqueada en cada extremo por un promotor T7. Se empleó para generar el dsRNAi contra los exones 3 y 4 de Cf2.

pGEM-Teasy dsRNAi lacZ. Contiene una copia del cDNA de lacZ, flanqueada en cada extremo por un promotor T7. Se empleó para generar el dsRNAi contra lacZ.

pGEM-Teasy Anti Cf2. Contiene un fragmento de 955pb del cDNA de Cf2 flanqueado por las enzimas de restricción XhoI y NcoI. Se empleó en la producción de la construcción pRSET B Cf2.

pRSET B Cf2. Contiene un fragmento de 955 pb del cDNA de Cf2 de *D. melanogaster*. Permite la expresión bacteriana de una proteína recombinante de Cf2 fusionada a una cola de Histidinas. Se empleó en la generación del anticuerpo contra Cf2.

pGEM-Teasy Anti Mef2. Plásmido que contiene un fragmento de 736pb del cDNA de *Mef2* flanqueado por las enzimas de restricción XhoI y NcoI. Se uso en la generación de la construcción pRSET B *Mef2*.

pRSET B *Mef2*. Contiene un fragmento de 736 pb del cDNA de *Mef2* de *D. melanogaster*. Permite la expresión bacteriana de una proteína recombinante de *Mef2* fusionada a una cola de Histidinas. Se uso para generar el anticuerpo contra *Mef2*.

pGEM-Teasy *Cf2*. Contiene una copia del cDNA de *Cf2* flanqueado por enzimas de restricción NcoI. Se empleo en la producción de la construcción pUAST *Cf2*.

pUAST *Cf2*. Contiene una copia del cDNA de *Cf2* de *D. melanogaster*, precedida por un motivo tipo UAS y el promotor basal hsp70. Nos permite la sobre-expresión de *Cf2* en *Drosophila*.

pGEM-Teasy *Cf2i* Directo. Contiene una copia de la secuencia genómica que va desde el exón 2 hasta el 4 (incluyendo intrones) de *Cf2* de *D. melanogaster* flanqueado por las enzimas de restricción NotI en el extremo 5' y SfiI en el extremo 3'. Se empleo en la producción de la construcción pGEM-Teasy RNAi *Cf2* Final.

pGEM-Teasy *Cf2i* Reverso. Plásmido que contiene una copia de los exones 1 y 2 del cDNA de *Cf2* de *D. melanogaster* en orientación inversa flanqueado por las enzimas de restricción SfiI en 5' y XbaI en el extremo 3'. Se empleo en la producción de la construcción pUAST RNAi *Cf2* Reverso.

pUAST *Cf2i* Reverso. Contiene una copia de los exones 1 y 2 del cDNA de *Cf2* de *D. melanogaster* en orientación inversa flanqueado por las enzimas de restricción SfiI en 5' y XbaI en el extremo 3'. Se empleo en la producción de la construcción pUAST RNAi *Cf2*.

pUAST *Cf2i*. En este caso la secuencia UAS dirige la expresión de una secuencia que genera un ssRNA con zonas con estructura de doble cadena capaz de interferir el mRNA de *Cf2* endógeno (Kennerdell et al. 2000).

4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados con la ayuda del programa informático Vector NTI Advance 10 (Rozen et al. 2000) y fueron sintetizados por Sigma. En la Tabla V se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5' a 3' y la aplicación para la que fueron

diseñados

Tabla V. Oligonucleótidos empleados (continúa en la página siguiente)

Nombre	Secuencia	Aplicación
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación
Sp6	GATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación
5' NcoI <i>Cf2</i>	GATCCATGGCGATGATAAAGTCCACCAC	cDNA <i>Cf2</i> UAS <i>Cf2</i>
3' NcoI <i>Cf2</i>	CCATGGCTAGAGCGGATGCAGCTTGGTC	cDNA <i>Cf2</i> UAS <i>Cf2</i>
5' XhoI <i>Cf2</i>	CTCGAGGCAGGGCTTTATGGAACAGCAG	Anti <i>Cf2</i>
5' NcoI <i>Mef2</i>	GATCCATGGATGGGCGCAAAAAAATTC	cDNA <i>Mef2</i>
5' XhoI <i>Mef2</i>	CTCGAGTCAACGACAGAGCCAGACATCG	Anti <i>Mef2</i>
3' NcoI <i>Mef2</i>	CTATGTGCCCCATCCGCC	cDNA <i>Mef2</i> Anti <i>Mef2</i>
5' SfiI <i>Cf2</i>	GGCCAATAAGGCCCGTGTGAGTCGTTAAATG	ssRNAi <i>Cf2</i>
3' XbaI <i>Cf2</i>	TCTAGAATGATAAAGTCCACCACGAA	ssRNAi <i>Cf2</i>
5' NotI <i>Cf2</i>	GATGCGGCCGCATGATAAAGTCCACCACGAA	ssRNAi <i>Cf2</i>
3' SfiI <i>Cf2</i>	GGCCAATAAGGCCCTGCAAAACAGCCACGA	ssRNAi <i>Cf2</i>
5' dsRNAi exón 2	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCGCAG GGCTTTATGGAACAGCAG	dsRNAi exón2
3' dsRNAi exón 2	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCTCTG CTTCGCCTGTGTGTATCT	dsRNAi exón2
5' dsRNAi exón 3	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCCGCC ACGCCCAAAGAAC	dsRNAi exones 3-4
3' dsRNAi exón 4	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCCTAG AGCGGATGCAGCTTGGTC	dsRNAi exones 3-4
5' dsRNAi <i>lacZ</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCCGGC TTCGTCTGGGACTG	dsRNAi <i>lacZ</i>
3' dsRNAi <i>lacZ</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCCGCC AATCCACATCTGTGAAAG	dsRNAi <i>lacZ</i>
5' <i>Gal4</i>	TCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA	Genotipado
3' <i>Gal4</i>	CAGCAGCCACTGGTAACAGGAT	Genotipado
5' GFP	CGAGGGCGAGGGCGA	Genotipado
3' GFP	CTTCTCGTTGGGGTCTTTGC	Genotipado
5' <i>lacZ</i>	TTGAAAATGGTCTGCTGCTG	Genotipado
3' <i>lacZ</i>	TCTCTCCAGGTAGCGAAAGC	Genotipado
5' Comp. <i>Cf2</i>	CCAGCAACAACAAGGTGCAGTA	Genotipado
3' Comp. <i>Cf2</i>	AAGCGAATGTATGTGCAAGCGT	Genotipado
3' <i>CG9650</i>	AACCCCATCAAGGGTTAAGG	Genotipado
3' <i>CG9650</i>	GGAAGTGCACCTCGTCTCACA	Genotipado
5' Comp.UAS <i>Cf2</i>	CAGCGTGAAGGACTATCTGACCAA	Genotipado
3' Comp.UAS <i>Cf2</i>	CCACTGCTCCCATTCATCAGTTC	Genotipado
5' Comp.UAS RNAi	GTATCGCCCGCCGCC	Genotipado
5' Comp.UAS RNAi	CACGTGCTCCTACTGCGGC	Genotipado

5. Anticuerpos y fluoróforos.

5.1. Anticuerpos primarios.

Los anticuerpos primarios empleados en inmuno histoquímica se muestran en la tabla Tabla VI, indicando el nombre del anticuerpo, el antígeno contra el que van dirigidos, la dilución a la que se

emplearon, la especie en que se generó el anticuerpo y el origen de los mismos.

Tabla VI. Anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Host	Origen
Anti Cf2	Cf2	(1:750)	Conejo	Laboratorio
Anti Mef2	Mef2	(1:5000)	Conejo	Laboratorio
Anti Mef2	Mef2	(1:1000)	Conejo	Guirish Melkhiani
Anti TnT	TnT	(1:1000)	Conejo	Laboratorio
Anti MyHC	MyHC	(1:1000)	Conejo	S.Bernstein
Anti Zfh1	Zfh1	(Mirar)	Conejo	Bhat, Krishna M.
Anti Odd	Odd-skipped	(1:500)	Conejo	Jim Skeath
Anti Tin	Tinman	(1:1000)	Conejo	Manfred Frasch
2B8	Even-skipped	(1:20)	Raton	Hybridoma Bank
4D4	Wingless protein	(1:100)	Raton	Hybridoma Bank
C555.6D	Slit protein	(1:200)	Raton	Hybridoma Bank
EC11	Pericardin	(1:100)	Raton	Hybridoma Bank
Anti Svp	Seven-up	(1:5)	Raton	Claude Desplan
Anti LacZ	LacZ	(1:2000)	Raton	Manuel Calleja
Anti GFP	GFP	(1:1000)	Raton	Roche
Anti Odd	Odd-skipped	(1:200)	Guinea Pig	Center for Segmentation Antibodies

5.2. Anticuerpos secundarios.

Los anticuerpos secundarios empleados en inmuno-histoquímica se muestran en la tabla VII indicando el tipo de anticuerpo secundario, la longitud de onda de absorción/emisión del fluorocromo que tiene asociado, la dilución a la que se emplearon y el origen de los mismos.

Tabla VII. Anticuerpos secundarios empleados

Anticuerpo	Fluoróforos	Dilución	Origen
Goat Anti-Rabbit	488/519	1:1000	Molecular Probes
Donkey Anti- Rabbit	488/519	1:1000	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse	488/519	1:1000	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit	546/572	1:1000	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse	546/572	1:1000	Molecular Probes
Goat Anti-Guinea Pig	555/576	1:500	Invitrogen
Donkey Anti-Goat	594/617	1:5000	Invitrogen
Goat Anti-Rabbit	647/670	1:1000	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse	647/670	1:1000	Molecular Probes

6. Medios de Cultivo y tampones generales.

Medio LB. Cada litro de medio contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, a pH 7,5 (ajustado con NaOH).

Tampón de microinyección. 100mM tampón fosfato; 5mM KCl.

Tampón de lisis. 20mM fosfato sódico (pH7.4), 500mM NaCl, 20mM Imidazol, 8M Urea y 0,2mg/ml de lisozima.

Tampón de Unión. 20mM fosfato sódico (pH7.4); 500mM NaCl; 20mM Imidazol; 8M Urea.

Tampón de Elución. 20mM fosfato sódico (pH 7.4); 500mM NaCl; 500mM Imidazol; 8M Urea.

Tampón de electro elución. 25mM Tris Base; 192mM Glicina; 01% SDS.

Tampón de unión Affigel. 100mM MOPS (pH 7.5); 0,1% Tween-20.

Tampón de elución Affigel. 100mM Glicina; HCl (pH 2.4); 150mM NaCl.

Solución de neutralización. Tris HCl 1M pH 8.

MÉTODOS

Los métodos generales de biología molecular, como el clonaje del DNA en plásmidos, la transformación de *E. coli*, la realización de cultivos bacterianos y las técnicas electroforéticas de proteínas y ácidos nucleídos se llevaron a cabo según protocolos estándar que han sido previamente descritos (Sambrook et al. 2001).

1. Microinyección de dsRNAi.

Los dsRNAi se generaron y recuperaron siguiendo las indicaciones del Kit MEGAscript RNAi de Ambion (http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_1626.pdf).

Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados para generar fragmentos de cDNA flanqueados por regiones promotoras T7 que nos permiten transcribir las dos cadenas del cDNA en una sola reacción de transcripción, obteniendo así fragmentos de RNA de cadena simple (ssRNA) complementarios, que se anillan para generar los dsRNAi empleados.

Los fragmentos de cDNA de *Cf2* empleados en la generación de los dsRNAi fueron amplificados mediante la técnica de PCR a partir del cDNA completo de *Cf2*, amplificado de una genoteca de cDNA de *D. melanogaster*, con los oligos 5' NcoI *Cf2* y 3' NcoI *Cf2*. El fragmento de 1533pb obtenido se clono en el vector pGEM-Teasy generando la construcción pGEM-T easy *Cf2*. Esta construcción se amplifico y secuencio en busca de posibles mutaciones en la secuencia del cDNA de *Cf2*. Tras comprobar la ausencia de mutaciones se uso como molde de amplificación de los distintos fragmentos de cDNA que se emplearon para generar los dsRNAi contra *Cf2*.

Se usaron las siguientes parejas de oligos:

5' dsRNAi exón1 y 3' dsRNAi exón 2. -Fragmento de 656pb que se empleo para producir el dsRNAi contra el exón 2 del cDNA de *Cf2*.

5' dsRNAi exón 3 y 3' dsRNAi exón 4. -Fragmento de 411pb que se utilizo para generar el dsRNAi contra los exones 2 y 3 del cDNA de *Cf2*.

5' dsRNAi *lacZ* y 3' dsRNAi *lacZ*. Como molde para generar el dsRNAi contra *lacZ* se empleo la secuencia de *lacZ* del vector pGEM-Teasy. Se genero un fragmento de 679pb, que se uso para producir el dsRNAi contra *lacZ*.

Los fragmentos amplificados con estos oligos se clonaron en el vector pGEM-Teasy, mediante técnicas estándar de clonaje, generando las construcciones pGEM-Teasy *dsRNAi e2*, pGEM-Teasy *dsRNAi e3-e4* y pGEM-Teasy *dsRNAi lacZ* que se emplearon para producir los *dsRNAi*. Estas construcciones se secuenciaron en busca de mutaciones en las regiones de *cDNA* de *Cf2* o *lacZ*. Una vez descartada la presencia de mutaciones, las construcciones se linearizaron con las enzimas de restricción adecuadas, para producir la transcripción *in vitro* de los fragmentos de *cDNA* a partir de las regiones promotoras T7. Tras la transcripción con T7 polimerasa se generaron *ssRNAi* que fueron anillados, por incubación a 75°C durante 5 minutos y dejando enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, generándose así los *dsRNAi*. Tras el anillamiento se trato cada solución de *dsRNAi* con una mezcla de DNAasa I y RNAasa para eliminar el molde de DNA y los *ssRNAi* no anillados.

Posteriormente los *dsRNAi* fueron recuperados siguiendo las instrucciones del kit MEGAscript RNAi y se microinyectaron de forma individual, a una concentración de 3µM en tampón de microinyección, mediante técnicas estándar, en embriones tempranos (<45 minutos) de la línea transgénica que expresa GFP bajo el control del promotor del gen de la Cadena Pesada de la Miosina (MyHC), denominada MyHC GFP, que permite por tanto analizar el patrón muscular en los embriones tras la microinyección de los distintos *dsRNAi*.

Se microinyectaron un total de 75 embriones por experimento. Cada experimento se repitió por triplicado.

2. Producción anticuerpos policlonales de conejo.

A lo largo de este trabajo se generaron anticuerpos policlonales en conejo contra las proteínas Cf2 y Mef2 de *Drosophila melanogaster*.

Para ello se diseñaron construcciones que nos permiten expresar en bacterias estas proteínas recombinantes fusionadas en la región amino terminal con una cola de Histidinas lo que nos facilita su purificación. Las proteínas purificadas fueron empleadas para inmunizar dos conejos con cada una. Se siguió un protocolo estándar de inmunización, durante un periodo de 10-12 semanas, tras lo que se obtuvo el suero de estos conejos. En las Figuras 8 y 9 se muestra un esquema general del procedimiento así como los resultados obtenidos en este proceso.

2.1 Generación de proteínas recombinantes.

Para generar las construcciones necesarias para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes se amplificaron fragmentos de cDNA de *Cf2* o *Mef2* con las siguientes parejas de oligonucleótidos:

5' XhoI *Cf2* y 3' NcoI *Cf2*. Fragmento de 955pb del cDNA de *Cf2*.

5' XhoI *Mef2* y 3' NcoI *Mef2*. Fragmento de 736pb del cDNA de *Mef2*.

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-Teasy generando las construcciones pGEM-Teasy *Cf2* y pGEM-Teasy *Mef2*. Estas construcciones fueron secuenciadas en busca de mutaciones en el cDNA de *Cf2* y *Mef2*. Una vez comprobada la ausencia de mutaciones las construcciones se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y XhoI y se recuperaron los fragmentos de 955pb y 736 pb que se clonaron en el vector pRSET B digerido con las mismas enzimas, generándose las construcciones pRSET B *Cf2* y pRSET B *Mef2* respectivamente, que tras ser secuenciadas se emplearon para expresar las proteínas recombinantes de *Cf2* y *Mef2*.

Con estas construcciones se transformaron bacterias competentes de la cepa BL21 en las que se llevo a cabo la expresión siguiendo métodos estándar. Para la purificación se emplearon las columnas HisTrap HP (GE Healthcare) siguiendo las directrices del fabricante.

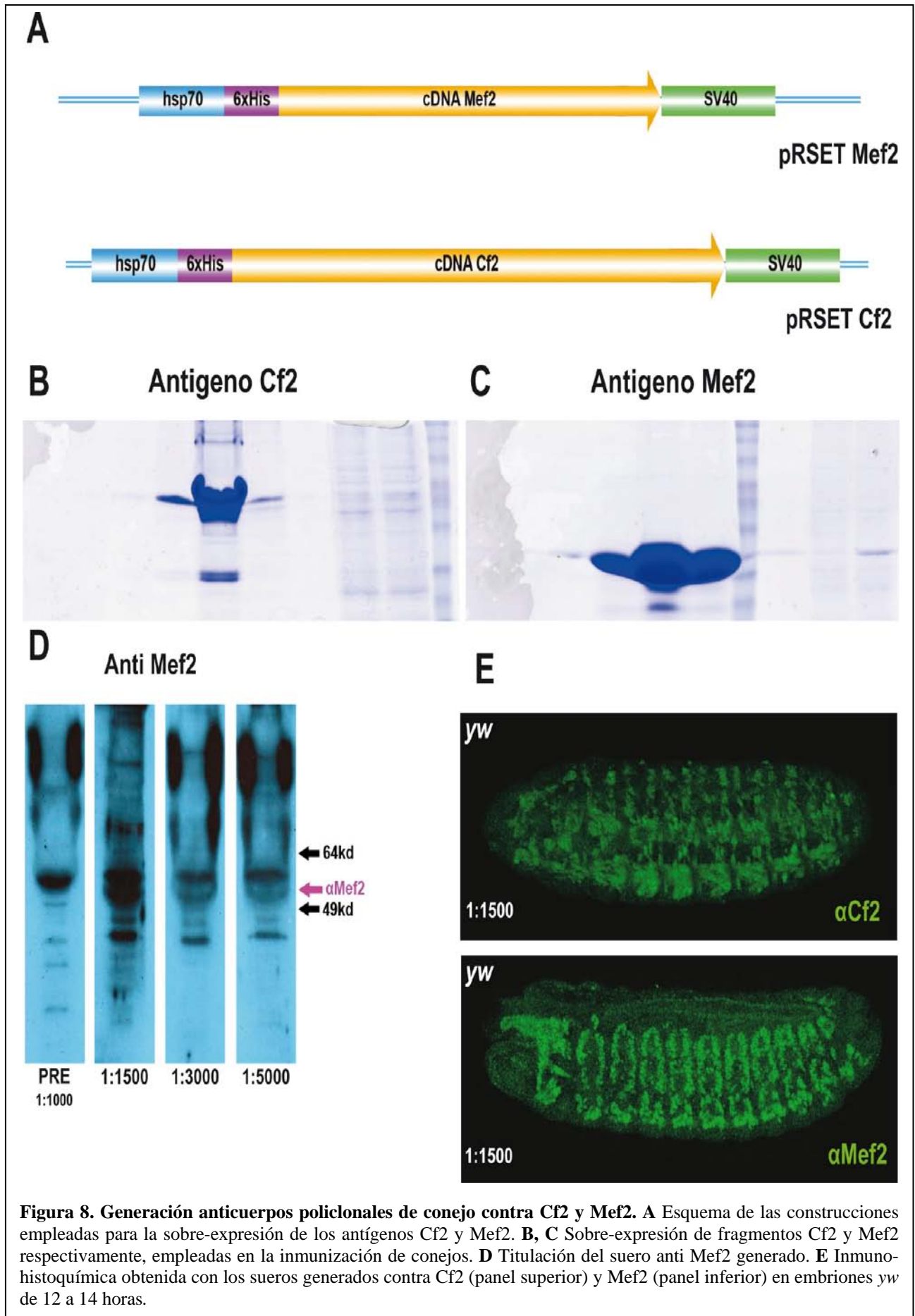
2.2 Purificación de proteínas recombinantes.

Una vez identificadas las fracciones con alta concentración de proteína recombinante se procedió a eliminar la Urea de estas muestras mediante electro-elución de proteínas utilizando un ElectroEluter 422 de BioRad, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determino la concentración de proteína en las muestras electro-eluidas mediante técnicas convencionales (en gel de poliacrilamida y ELISA). La eficiencia de recuperación tras la elución fue de un 80%.

2.3 Inmunización de conejos.

La inmunización de los conejos se realizo según protocolos estándar. En la primera inoculación se empleo adyuvante de Freud completo mientras que en las restantes inoculaciones se empleo el adyuvante incompleto. Se realizaron un total de 6 inoculaciones por cada conejo con una separación de 1 semana en las 4 primeras inoculaciones y de 2 semanas entre la quinta y sexta. La primera inoculación fue intradérmica, las 3 siguientes fueron intramusculares y las dos últimas subcutáneas. Tras cada inoculación se extrajeron entre 5 y 10ml de sangre que se proceso para generar sueros que



fueron titulados mediante la técnica de Western Blot. Dos semanas después de la última inoculación se sangraron los conejos obteniéndose los sueros finales contra Cf2 y Mef2. Estos sueros fueron titulados detectándose señal usando los sueros anti Cf2 y anti Mef2 a una concentración de 1:3000 y 1:7500 respectivamente. El mayor problema con estos sueros fue que daban un alto grado de fondo por lo que decidimos inmunoabsorber estos sueros con el fin de reducir el fondo inespecífico.

2.4 Inmunoabsorción de Anticuerpos policlonales.

Para limpiar los sueros generados optamos por realizar una purificación por afinidad para lo que utilizamos Affigel 10-15 (BioRad). Las proteínas recombinantes de Cf2 o Mef2, se fusionaron a través de su extremo amino terminal al Affigel siguiendo las instrucciones del fabricante. Como el Affigel es incompatible con la alta concentración de Urea en la que obtenemos las proteínas recombinantes tras su purificación en las columnas HisTrap HP tuvimos que cambiar el tampón de las proteínas recombinantes antes de poder unirlos al Affigel para lo que utilizamos las unidades de filtración por centrifugación Microcon YM3 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante e introduciendo un paso de lavado adicional antes de la recuperación final de la proteína. El lavado adicional se realizó con el mismo medio en el que finalmente recuperamos la proteína. Tras este proceso obtuvimos las proteínas recombinantes en un buffer de unión adecuado para su uso con el Affigel.

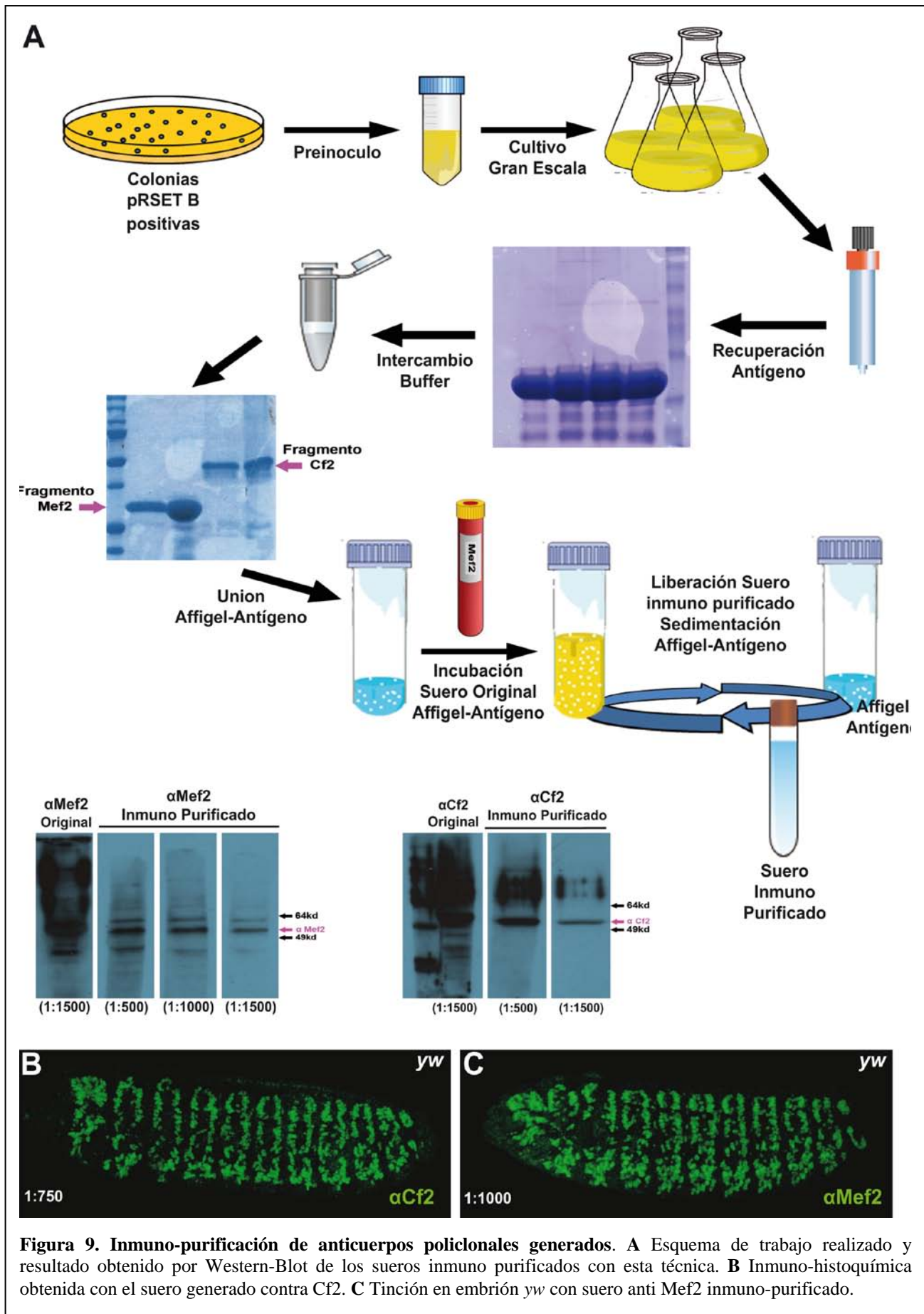
Para cada suero un total de 10mg de proteína recombinante se acoplo a 500µl de Affigel 10- 15, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los pasos fueron realizados a 4°C.

Cada 500µl de Affigel activado con la proteína recombinante se empleo para inmunoabsorber 2ml de suero anti Cf2 o anti Mef2, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos inmuno-absorbidos se eluyeron con 1ml de tampón de elución. El eluido se neutralizo con 200µl de Solución de neutralización. Este proceso se repitió una segunda vez obteniendo así 2 eluciones para cada anticuerpo. Tras este proceso se regenero el Affigel siguiendo las instrucciones del fabricante. EL Affigel regenerado se almacena en PBS en presencia de 0,2 % Azida Sódica, a 4°C para su posterior reutilización.

Las eluciones obtenidas con este proceso fueron alícuotadas y almacenadas a -70°C. Una de estas alícuotas para cada anticuerpo fue testada mediante la técnica de western blot por comparación con la señal obtenida con el anticuerpo original (Figuras 8 y 9).

3. El sistema UAS/ Gal4.

Para el análisis de los efectos de la sobre-expresión y el silenciamiento de Cf2 en esta tesis hemos empleado el sistema de expresión regulable UAS/Gal4 desarrollado por Brand y Perrimon



(Brand et al. 1993), que permite la expresión selectiva de los genes clonados en patrones específicos de tejido, celulares, y/o temporales en *D. melanogaster*. Para ello se cruzaron las diferentes líneas activadoras Gal4, que expresan el factor Gal4 bajo el control de diferentes promotores (pudiendo dirigir así su expresión en diferentes tejidos y etapas del desarrollo) con las líneas transgénicas efectoras UAS, que portan el transgen que nos interesa expresar bajo el control de secuencias UAS, a las que se une el factor Gal4.

3.1. Generación construcciones pUAST.

3.1.1. Sobre-expresión de *Cf2*.

Se digirió la construcción pGEMT easy *Cf2* (anteriormente descrita) con las enzimas de restricción NcoI tras lo que se recupero el fragmento de 1555pb que se clono en el vector pUAST digerido con NcoI generándose la construcción pUAST *Cf2* empleada en el estudio de la sobre-expresión de *Cf2*.

3.1.2. Silenciamiento de *Cf2*.

Para producir esta construcción antes tuvimos que generar las siguientes construcciones:

-pGEM-Teasy *Cf2i* Directo. Esta construcción se genero clonando el fragmento amplificado con los oligos 5' NotI *Cf2* y 3' SfiI *Cf2* a partir de una extracción de DNA genómico de *Drosophila*. El fragmento de 3196pb resultante se clono en el vectro pGEMT easy.

- pGEM-Teasy *Cf2i* Reverso. Se emplearon los oligos 5' SfiI *Cf2* y 3' XbaI *Cf2* para amplificar un fragmento de 1370pb a partir de cDNA de *Cf2*. Este fragmento contenía los exones 1 y 2 del cDNA de *Cf2* en dirección opuesta. Este fragmento se clono en el vector pGEM-Teasy.

La generación de la construcción pUAST *Cf2i* la realizamos en 2 etapas, primero digerimos la construcción pGEM-Teasy *Cf2i* Reverso con las enzimas de restricción NotI y XbaI tras lo que recuperamos el fragmento de 1374pb generado. Este fragmento se clono en un vector pUAST digerido con las mismas enzimas. Generando la construcción pUAST *Cf2i* Reverso. A continuación pasamos a introducirle el segundo fragmento de la construcción final. Para ello digerimos la construcción pGEM-Teasy *Cf2i* Directo con NotI y SfiI, tras lo que recuperamos el fragmento de 3196pb. Este fragmento se clono en la construcción pUAST *Cf2i* Reverso digerida con NotI y SfiI obteniendo así la construcción final pUAST *Cf2i*

3.2. Generación líneas transgénicas de *Drosophila*.

Las líneas transgénicas se generaron utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P descrita inicialmente por Spradling y Rubin (Rubin et al. 1982) a partir de la línea yw

que se caracteriza por tener los ojos blancos en el estadio adulto.

Con esta técnica se generaron las líneas transgénicas UAS *Cf2s* 86, UAS *Cf2s* 77, UAS *Cf2i* 5, UAS *Cf2i* 12. Las dos primeras se emplearon para estudiar los efectos *in vivo* de la sobre-expresión de *Cf2* mientras que las dos últimas se usaron para analizar el efecto del silenciamiento de *Cf2*.

Para el mapeo cromosómico de las inserciones se utilizaron técnicas estándar de genética de moscas (Greenspan 1997).

3.3. Generación líneas UAS-Gal4.

Para generar estas líneas se cruzaron las líneas transgénicas descritas en el apartado anterior contra líneas balanceadas que expresan Gal4 bajo el control del promotor de *twist* (*twi*-Gal4) o de *Mef2* (*Mef2*-Gal4). A continuación se muestran los cruces realizados para obtener las líneas en estudio en este trabajo, en las Tablas VIII y IX

$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{MKRS}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{X}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	$\frac{X}{X} + \frac{Mef2 Gal4}{Mef2 Gal4}$	X	$\frac{X}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{MKRS}{Tm6, Tb}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{MKRS}{Tm6, Tb}$	$\frac{X}{X} + \frac{Mef2 Gal4}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{X}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$
$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	$\frac{X}{X}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{X}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$
$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	$\frac{X}{Y}; \frac{sp}{CyOGFP}; \frac{830}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm6, Tb}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{UAS}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{X}{Y} + \frac{Mef2 Gal4}{Mef2 Gal4}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$
$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$	X	$\frac{UAS}{Y}; \frac{If}{CyO}; \frac{Mef2 Gal4}{Tm3, Ser Act5C GFP}$

Tabla IX. Esquema de los cruces realizados para generar las líneas efectoras UAS *Cf2Mef2*-Gal4, que nos permitió analizar los efectos de la sobre-expresión y silenciamiento de *Cf2* dirigidas por el promotor de *Mef2*.

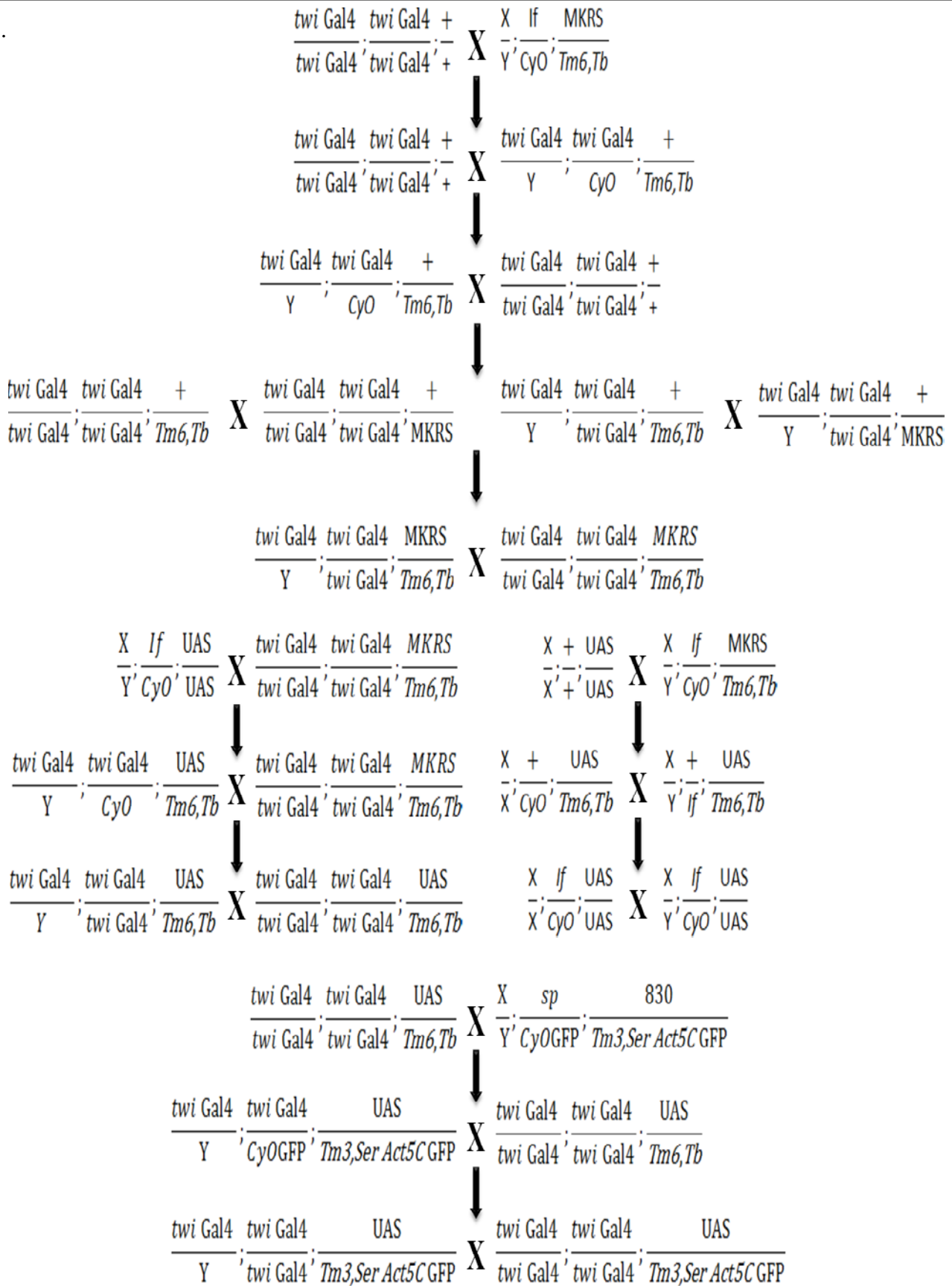


Tabla VIII. Esquema de los cruces realizados para generar las líneas efectoras *UAS twi Gal4* empleadas en este estudio. Nos permitieron analizar los efectos de la sobre-expresión y silenciamiento de *Cf2* dirigidas por el promotor de *twist*.

4. Inmuno-histoquímica.

Las técnicas de inmuno-histoquímica permiten la identificación, sobre gran variedad de muestras (tisulares, citológicas, etc), de los antígenos deseados. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre las diversas muestras permite la localización anatómica de la expresión del antígeno, su correlación con parámetros morfológicos, variaciones en los niveles de expresión, sensibilidad, especificidad, etc, dependiendo del tipo de estudio, proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

A lo largo de este trabajo se realizaron numerosos ensayos inmuno-histoquímicos, sobre embriones de diversas etapas de desarrollo de las distintas líneas analizadas, mediante un protocolo estándar (*Drosophila* Protocols <http://www.ceolas.org/VL/fly/protocols.html>) con una única modificación como es que empleamos como solución de bloqueo, antes de la incubación con el anticuerpo primario, el producto Image-iT™ FX Signal Enhancer (I36933) de MolecularProbes, en vez de la típica solución de bloqueo (PBS(1x),0,1% TritonX100,5% NGS).

Las concentraciones a las que se emplearon los distintos anticuerpos (primarios y secundarios) en los diferentes ensayos se indicaron en las tablas V y VI de la sección de Materiales.

Las muestras generadas mediante esta técnica fueron analizadas en el Laboratorio de Microscopía Confocal del S.I.D.I. de la U.A.M.usando un microscopio confocal invertido. Para la obtención de las fotos presentadas se emplearon, tanto el Leica TCS SP2, como el Leica TCS SP5, disponibles en el servicio.

Las imágenes recopiladas para este trabajo fueron analizadas con el software libre ImageJ en su versión 1.43t (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

5. Cuantificación de los niveles de mRNA.

La cuantificación relativa de los niveles de mRNA se realizó mediante PCR a tiempo real usando un equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem). El RNA de las muestras fue extraído y cuantificado según protocolos estándar (Sambrook et al. 1989).

Para cada reacción de PCR se retrotranscribió 1µg de RNA de cada muestra por separado utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó utilizando sondas Taqman marcadas con FAM para los genes de *Cf2* y *Mef2* de *D. melanogaster*, diseñadas por Applied Biosystems. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron establecidas por el Servicio de Secuenciación y PCR en tiempo

Real del instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. En todos los casos se analizaron por triplicado al menos 8 muestras individuales por cada línea en estudio.

5.1 Ensayos de RT-PCR cuantitativa.

Diez individuos de cada genotipo se emplearon para extraer RNA con Trizol. 1µg de RNA se empleó en la reacción de retro transcripción a cDNA usando el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Como control de normalización interno se empleo el gen 18S rRNA. Se realizaron reacciones de PCR empleando como molde el producto retrotranscrito, con el Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La amplificación se llevo a cabo en un sistema ABI PRISM 700 Sequence Detection (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones: 2min50°C, 10min95°C, 40 ciclos (39s95°C, 30s60°C, 30s68°C), y un ciclo(15s95°C, 1min60°C, 1min95°C).

El parámetro critico de la RT -PCR es el ciclo umbral Ct (threshold cycle) que nos define el momento de la reacción en el que con un menor número de ciclos se genera la mayor cantidad de DNA que proporciona una señal de fluorescencia significativa. El Ct es inversamente proporcional al número de copias de DNA original. Para cada muestra se calcula el ΔCt restando al Ct_{muestra} el Ct control (Ct_{18S}). posteriormente se calculo $e^{\Delta\Delta Ct}$ según la fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mutante}} - \Delta Ct_{yw}$. finalmente se calcula la proporción de mRNA del control yw frente al del gen en estudio mediante la

$$\text{fórmula} \left(\frac{mRNA_{\text{muestra}}}{mRNA_{yw}} \right) = 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ (Livak et al. 2001)}$$

6 Genotipado de líneas en estudio.

El hecho de que las líneas analizadas en este estudio no sean viables en homocigosis dificulto el análisis por PCR cuantitativa ya que no teníamos forma de distinguir entre los embriones homocigotos y heterocigotos para cada genotipo. Los marcadores lacZ y GFP empleados en los cromosomas balanceadores no eran aptos para la correcta identificación de los embriones antes de realizar la extracción de RNA.

Para solventar este inconveniente aplicamos la técnica descrita por Ghanim y White en el 2006 (Ghanim et al. 2006). Esta técnica nos permitió identificar de manera fiable los embriones homocigotos y heterocigotos de las distintas líneas en estudio (sobre-expresión, silenciamiento y deficiencia de Cf2). Esta técnica consiste en realizar el genotipado individual de los embriones para cada línea, antes de proceder a la extracciónrecuperación del RNA total.

Cada embrión individual se homogenizo en un tubo de PCR de 200µl, con una punta de una pipeta, en un volumen de 15µl de buffer de homogenización (100 mM Tris-Cl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinasa K). De estos 15 µl se transfieren 4,5µl a un nuevo tubo de PCR. En los 10,5µl restantes se incorporan 30µl de TRIzol (Invitrogen) y se almacena a -20°C para su posterior utilización. El tubo con los 4,5µl se incubo con Proteinasa K durante 30 minutos a 28°C, tras lo que esta se inactivo por tratamiento a 95°C durante 5 minutos.

Estos 4,5µl se emplearon como molde en tres reacciones de PCR (1,5µl molde por reacción PCR) para cada embrión. En cada reacción de PCR se emplearon, 20pmol de cada primer, 0,5mM de una mezcla de NTP y 1U de Taq Polimerasa Dynazyme II (Finnzymes) en un volumen final de 15µl. La ausencia o presencia de los distintos genes testados (*Cf2*, *GFP*, *lacZ*, *CG9650*) en las PCR nos permite identificar de forma segura los embriones homocigotos y heterocigotos de cada línea en estudio. Una vez identificados los embriones deseados (homocigotos o heterocigotos) se realizaron agrupaciones de 10 embriones antes de proceder a la recuperación del RNA total mediante técnicas estándar.

Se genotiparon más de 300 embriones por cada línea lo que nos permitió realizar 8 agrupaciones de 10 embriones para cada línea.

En el genotipado por PCR empleamos las siguientes parejas de oligos

5' *CG9650* y 3' *CG9650*. Permite amplificar un fragmento del gen *CG9650* (en el cromosoma I) de 455pB. Empleado como control positivo de PCR en el genotipado de todas las líneas.

5' *lacZ* y 3' *lacZ*: Permite amplificar un fragmento del DNA de *lacZ* de 580pB. Empleado para el genotipado de la línea deficiente *Df2γ*²⁷.

5' Comp. *Cf2* y 3' Comp. *Cf2*. Permite amplificar un fragmento de 372pb del intrón 1 del gen *Cf2* de *D. melanogaster*. Se empleo en el genotipado de la línea deficiente *Df2γ*²⁷.

5' *GFP* y 3' *GFP*. Permiten amplificar una fragmento de 550pb del DNA de *GFP*. Se empleo en el genotipado de las líneas UAS *Mef2*-Gal4 y UAS *Tw*iGal4 (tanto sobre-expresión como interferencia).

5' *Gal4* y 3' *Gal4*. Permite amplificar un fragmento del DNA de *Gal4* de 450pB. Empleado para el genotipado de las líneas UAS *Mef2*-Gal4 (sobre-expresión e interferencia)

5'Comp.UAS *Cf2* y 3'Comp.UAS *Cf2*. Permite amplificar un fragmento de 364pb de la construcción pUAST *Cf2* usada para generar las líneas empleadas para el estudio de la sobre-expresión. Se empleo en el genotipado de la línea *twi* Gal4; *twi* Gal4;UAS *Cf2* 71/*Tm3SerGFP*.

5'Comp.UAS RNAi y 3'Comp.UAS RNAi. Permite amplificar un fragmento de 472pb de la construcción pUAST RNAi *Cf2* usada en las líneas transgénicas empleadas para el estudio del silenciamiento de *Cf2*. Se empleo en el genotipado de *twi* Gal4;*twi* Gal4;UAS RNAi *Cf2* 5/*Tm3Ser GFP*.

Resultados

Resultados

Estudios de diferentes laboratorios, entre ellos el nuestro, demostraron que Cf2 desempeña un papel esencial en la diferenciación muscular (Gajewski et al. ; Bagni et al. 2002; García-Zaragoza et al. 2008; Tanaka et al. 2008). Cf2 se expresa en los tres tipos de músculo tanto en embriones como en adultos (Bagni et al. 2002). Estudios funcionales realizados en el laboratorio en mutantes hipomorfos de *Cf2*, demostraron que la disminución en los niveles de esta proteína provoca la desregulación de la transcripción de los genes musculares sarcoméricos. Estas alteraciones en los niveles de expresión de estos genes se acompañan de anomalías estructurales y funcionales del músculo agravadas con la edad. *Cf2* participa directamente en la regulación transcripcional de estos genes. Es más, resultados obtenidos tanto por el grupo de R. Cripps (Tanaka et al. 2008) como por nuestro grupo demuestran que *Cf2* interacciona genéticamente con *Mef2*, el principal regulador de la miogénesis en *Drosophila*. Ambos factores de transcripción colaboran en la regulación transcripcional de un gran número de genes de expresión muscular (García-Zaragoza et al. 2008). Estos resultados demuestran que Cf2 se requiere para el desarrollo normal del músculo de *Drosophila* y también para su mantenimiento.

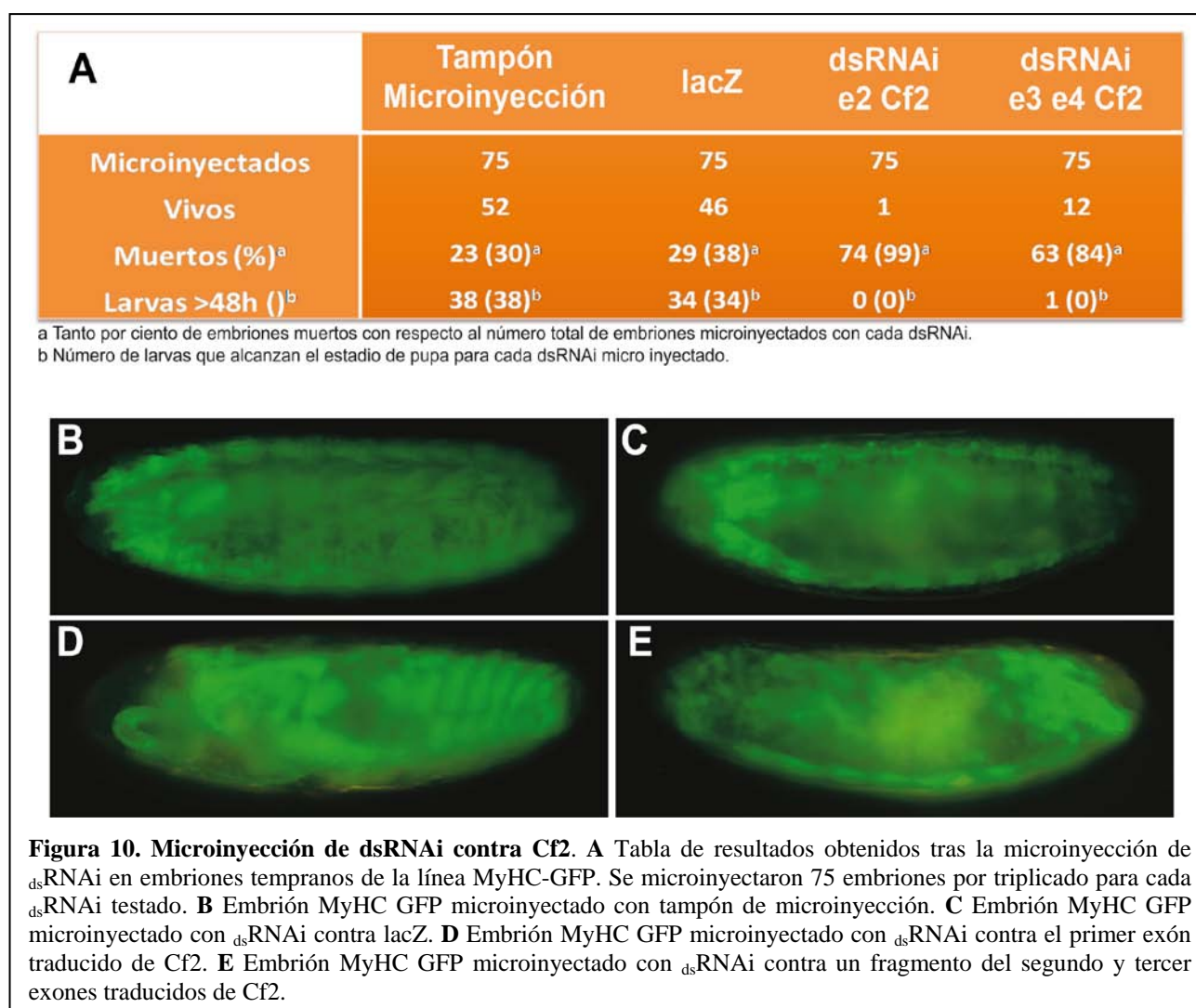
Con objeto de profundizar nuestro estudio del papel de *Cf2* en la diferenciación y mantenimiento del sistema muscular de *Drosophila* en este trabajo se presenta el estudio de la función de este factor de transcripción en el desarrollo temprano de la mosca. Para ello, como paso inicial en su desarrollo se decidió generar un anticuerpo policlonal específico contra la proteína Cf2 y otro contra Mef2 (ver Materiales y Métodos). Paralelamente se realizó un estudio fenotípico del efecto que produciría la interferencia del mRNA de *Cf2* mediante la microinyección directa de dsRNAi en embriones en la etapa de blastodermo sincitial. En la segunda parte de este trabajo y una vez confirmado que *Cf2* desempeña un papel esencial en la diferenciación muscular desde etapas tempranas del desarrollo se procedió a realizar un estudio más profundo de la función específica de este factor de transcripción en la diferenciación muscular embrionaria usando para ello líneas transgénicas que expresan distintos niveles de Cf2, sobre-expresión o silenciamiento, que fueron generadas durante el desarrollo de este trabajo, así como una línea que presenta una deficiencia en *Cf2*.

Cf2 y el desarrollo embrionario temprano: Microinyección de dsRNAi en embriones tempranos de *Drosophila*.

La microinyección se realizó en embriones de la línea transgénica MyHC-GFP que expresa GFP bajo el control del promotor de la MyHC. La utilización de esta línea de *Drosophila* nos permitió

identificar *in vivo* todos los músculos embrionarios ya que GFP se expresa exclusivamente en el músculo y facilita el análisis de cualquier posible defecto muscular debido la disminución en los niveles de Cf2. La microinyección de un dsRNAi contra lacZ, gen que no se encuentra en el genoma de *Drosophila* o de tampón de microinyección solo, fueron controles para validar los resultados obtenidos. Se recogieron embriones de menos de 45 minutos, se microinyectaron en la fase de blastodermo sincitial y se dejaron desarrollar hasta las 23-24 horas en cámaras de 25 °C momento en que se procedió a su observación y análisis.

En los embriones microinyectados con los diferentes dsRNAs específicos de e2 y e3 e4, se analizó la viabilidad, tanto embrionaria (número de embriones que completan el desarrollo embrionario), como larvaria (número de larvas que alcanzan el tercer estadio larvario). Además se analizó la morfología muscular de los embriones microinyectados a fin de poder determinar si existían diferencias morfológicas apreciables entre embriones microinyectados con los distintos dsRNAi contra Cf2 y los embriones control. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.



Un 84% de los embriones microinyectados con *dsRNAi* contra los exones 3 y 4 de *Cf2* mueren en etapas tempranas del desarrollo embrionario, mientras que en el caso de la microinyección del *dsRNAi* contra el exón 2 de *Cf2* el porcentaje de embriones muertos 24h después de la microinyección fue del 99% (Figura 10A). Sin embargo, los embriones microinyectados con *dsRNAi* contra *lacZ* o solo con tampón mostraron una letalidad embrionaria mucho más baja, 38% y 30% respectivamente (ver Figura 10A). De todos los embriones microinyectados con *dsRNAi* contra *Cf2* (contra el exón 2 y contra los exones 3 y 4) tan solo emergieron 13 larvas, ninguna de las cuales fue capaz de alcanzar el estadio de pupa. Las que alcanzaron estadios más avanzados murieron en larva de 2º o 3º estadio. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que *Cf2* tiene un papel esencial en etapas tempranas del desarrollo. Por otra parte la incapacidad para desarrollarse demostrada por las pocas larvas supervivientes apunta a que la función de este factor de transcripción también es necesaria en esta etapa.

El análisis morfológico de los embriones 24 horas después de la microinyección (Figura 10B-E) demostró que la mayor parte de embriones microinyectados con *dsRNAi* contra *Cf2* no llegaban a formar el sistema muscular, muriendo en etapas muy tempranas del desarrollo sin estructuras musculares diferenciables. En la Figura 10 D y E se muestran dos de los embriones que alcanzaron etapas de desarrollo más avanzadas. Sin embargo, un elevado porcentaje de los embriones microinyectados solo con tampón o con *dsRNAi* contra *LacZ*, desarrollaron una musculatura normal (Figura 10B y C). Estos resultados, confirman nuestra hipótesis de que *Cf2* es esencial para el desarrollo normal del sistema muscular embrionario-larvario en *Drosophila*. A la luz de estos resultados, decidimos realizar un análisis más profundo de la función de *Cf2* en el desarrollo muscular de *Drosophila*.

Los niveles de *Cf2* deben estar fuertemente regulados durante el desarrollo embrionario.

Para llevar a cabo el estudio funcional de *Cf2* decidimos analizar el efecto del aumento o disminución de sus niveles de expresión, para lo que se generaron varias líneas transgénicas de *Drosophila*. Las líneas generadas, *UAS Cf2s* y *UAS Cf2i* expresan, respectivamente, el cDNA de *Cf2* o un *ssRNA* con zonas con estructura de doble cadena capaz de interferir el mRNA de *Cf2*. En la Figura 11A se muestra un esquema de los fragmentos utilizados para la generación de las construcciones. Los fragmentos insertados en el genoma de *Drosophila* contienen en 5' el promotor basal de *hsp70* y cinco secuencias *UAS* y en 3' la secuencia de terminación de SV40. La expresión

de ambas secuencias, $cDNA$ y $ssRNA$ de *Cf2*, está controlada por las secuencias UAS (Webster et al. 1988; Lillie et al. 1989; Brand et al. 1993). Estas secuencias dirigen la expresión de los genes que controlan en respuesta a la presencia del factor de transcripción de levadura Gal4. La utilización de líneas transgénicas en las que Gal4 se expresa de forma restringida en ciertos territorios o momentos permite, en las líneas transgénicas dobles, sobre-expresar o silenciar *Cf2* en dominios concretos. De las diferentes líneas independientes generadas se han utilizado para este estudio las siguientes: 1) UAS *Cf2s* 86 y UAS *Cf2s* 71 que sobre-expresan *Cf2* y tienen el inserto en los cromosomas X y 3 respectivamente y 2) UAS *Cf2i* 5 y UAS *Cf2i* 12 que interfieren *Cf2* y que tienen el inserto en los cromosomas 3 y X respectivamente (ver Materiales y métodos). La elección de estas líneas se basó en que las inserciones estuvieran situadas en distintos cromosomas o posiciones.

En este trabajo se han utilizado fundamentalmente dos líneas de expresión de Gal4: *twist*-Gal4 y *Mef2* Gal4 en las que la expresión de Gal4 es dirigida por los promotores de *twist* y *mef2* respectivamente (Baylies et al. 1996; Ranganayakulu et al. 1996). A lo largo de esta tesis nos referiremos a estas líneas como “drivers”. El “driver” *twist* Gal4 se expresa en todo el mesodermo en etapas tempranas del desarrollo embrionario así como en los precursores musculares en los estadios embrionario-larvario y adulto. El “driver” *Mef2* Gal4 dirige la expresión de Gal4 con un patrón muscular general a partir del estadio 6-7. Las líneas dobles transgénicas sobre-expresaran o silenciaran *Cf2* en estos territorios y se denominan *Mef2* Gal4>UAS RNA *Cf2* o *twi* Gal4>UAS-RNA *Cf2* cuando sobre-expresan el factor *Cf2* o *Mef2* Gal4>UAS RNAi *Cf2* o *twi* Gal4>UAS-RNAi *Cf2* cuando interfieren el mensajero de *Cf2*. En versión abreviada aparecen en el texto como *Mef2/Cf2s*, *twi/Cf2s* para las líneas que sobre-expresan el factor y *Mef2/Cf2i* y *twi/Cf2i* para las que presentan pérdida parcial de función. Por otra parte, en este trabajo se ha completado el estudio de un mutante de delección, *Df2 γ^{27}* (Lane et al. 1993; Hsu et al. 1996; Ricard et al. 2001). Estas moscas presentan una delección de aproximadamente 20 Kb que cubre el loci completo de *Cf2* así como otros loci situados en la región 5' del gen *Cf2*, como los de *gcm*, *l(2)B73*, *l(2)DA2* (Lane et al. 1993; Ricard et al. 2001). La utilización conjunta de este mutante de delección y las líneas de RNAi nos permitirá corroborar la especificidad de los fenotipos observados.

Se generaron líneas dobles transgénicas UAS y Gal4 con ambos “drivers”, tanto para la sobre-expresión como para la interferencia (ver Materiales y métodos). Inicialmente se analizaron, de forma semi-cuantitativa, los niveles relativos de mRNA de *Cf2* en las cuatro líneas UAS dirigidas por ambos “drivers” mediante RT-PCR convencional. Los resultados obtenidos se muestran en la

Figura 11. Se aprecia que en las cuatro líneas que portan una inserción UAS *Cf2s* hay una mayor cantidad de mensajero (Figura 11C). Por el contrario, en el caso de las líneas UAS *Cf2i* se observa un claro descenso en los niveles de mRNA de *Cf2* (Figura 11D). Finalmente, cabe destacar que los efectos sobre el nivel total de mensajero de *Cf2* en las distintas líneas son homogéneos, es decir, no existen variaciones relevantes entre las distintas líneas generadas.

Sorprendentemente, al establecer las líneas dobles transgénicas UAS y Gal4 no se pudieron establecer líneas homocigóticas para las dos inserciones en ningún caso ni para la sobre-expresión ni para la interferencia. Con el fin de constatar que la letalidad de estas líneas es debida a la variación de los niveles de *Cf2* y no por la localización de las inserciones UAS o Gal4 se realizaron cruces entre distintas líneas dobles transgénicas del mismo tipo, es decir con el mismo “driver”. De esta forma se trataron de obtener animales que presentaban dos copias tanto del “driver” como de la inserción UAS no estando estas últimas en homocigosis. De nuevo, estas líneas resultaron ser letales (Figura 11E). Hay que puntualizar que todas las líneas individuales generadas UAS *Cf2s* o UAS *Cf2i*, así como las líneas *Mef2* Gal4 y *twi* Gal4 utilizadas son homocigóticas viables. Estos resultados permiten concluir que la letalidad observada en las líneas dobles transgénicas UAS-Gal4 es debida al efecto de las variaciones en los niveles de *Cf2*. Por otra parte, que ninguna de las líneas UAS-Gal4 generadas fuese viable en homocigosis junto a ninguno de los “drivers”, sugiere que los niveles de *Cf2* han de estar muy regulados durante el desarrollo. Fuertes variaciones en los niveles de este factor de transcripción resultan en letalidad embrionaria, en el caso de la sobre-expresión, o larvaria tardía, en el caso de la interferencia.

Una vez comprobado que las líneas transgénicas UAS funcionaban correctamente, comenzamos el análisis funcional de *Cf2* mediante técnicas de inmuno-histoquímica. Esta aproximación nos permite obtener, a lo largo del tiempo, una visión detallada del papel de *Cf2* en el desarrollo del sistema muscular de *Drosophila*. Inicialmente se analizó la expresión de *Cf2* y *Mef2* en embriones de 12 a 14h AEL (etapas 15-16) tanto en líneas que sobre-expresan *Cf2* como en aquellas en las que su expresión ha sido interferida. Para poder diferenciar los embriones homocigóticos y heterocigóticos, estos análisis se llevaron a cabo en presencia del balanceador *Tm3, Ser ActGFP*.

Este balanceador porta una inserción que contiene la secuencia de la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor de la *Actina5C*. Así, solo aquellos embriones negativos para la expresión de GFP son homocigóticos para ambas inserciones, UAS y Gal4

En primer lugar se analizó la expresión de *Cf2* con un anticuerpo contra este factor (ver Figura 12 y Materiales y Métodos). El análisis de embriones que sobre-expresan *Cf2* desde el “driver”

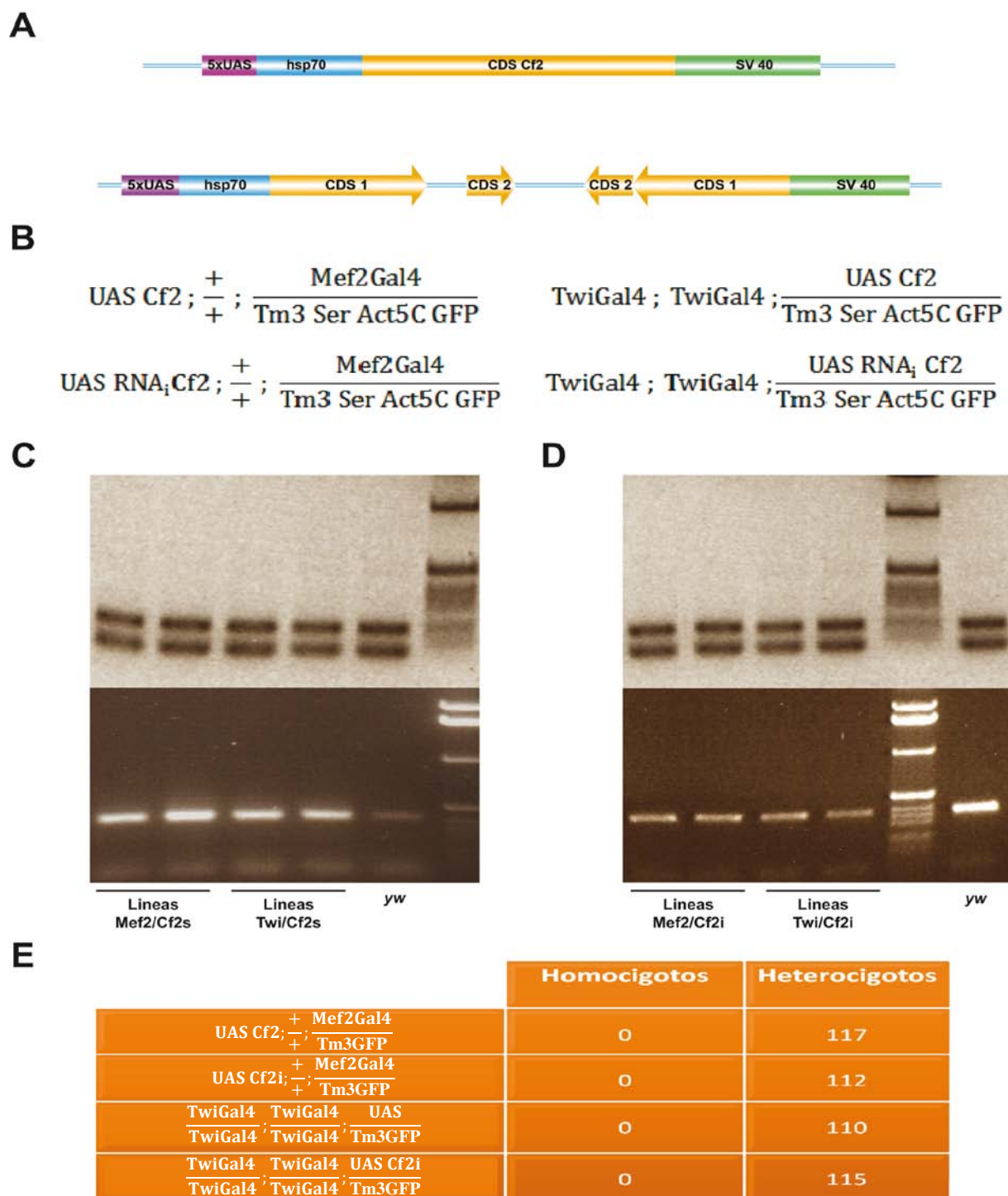


Figura 11. Generación y análisis de líneas transgénicas UASGal4. **A** Construcciones empleadas para la generación de las líneas UAS que nos permiten analizar los efectos de la sobre-expresión (superior) y el silenciamiento de Cf2 (inferior). **B** Genotipos generales de las líneas dobles transgénicas generadas con las construcciones UAS Cf2 y los "drivers" Mef2Gal4 y TwilGal4. **C** Análisis por RT-PCR semi cuantitativa de las líneas empleadas en el estudio de viabilidad de las líneas UASGal4 para la sobre-expresión de CF2. Se muestran los resultados obtenidos en dos líneas UAS Cf2s distintas para cada "driver" Gal4 empleado. En el panel superior se muestra el control de carga de la RT-PCR (fragmento de la Cadena Pesada de la Clatrina (chc)) y en el panel inferior la amplificación de Cf2 total. **D** Análisis por RT-PCR semi cuantitativa de las líneas empleadas en el estudio de viabilidad de las líneas UASGal4 para la interferencia de CF2. Se muestran los resultados obtenidos en dos líneas UAS Cf2i distintas para cada "driver" Gal4 empleado. En el panel superior se muestra el control de carga de la RTPCR (fragmento de chc) y en el panel inferior la amplificación de Cf2 en dos líneas UAS Cf2 distintas para cada "driver" Gal4 empleado. **E** Tabla de resultados del análisis de la letalidad en homocigosis de las líneas UAS Gal4 generadas.

Mef2 Gal4, reveló que en los embriones heterocigóticos para el “driver” y homocigóticos para UAS RNA *Cf2*, se observan niveles de expresión de *Cf2* mucho más altos que en los individuos *yw* (comparar Figura 12 A y B). Así mismo, se observa que los embriones homocigotos para ambas inserciones, identificados por la ausencia de GFP, están completamente desorganizados, y que esta desorganización se produce en etapas tempranas del desarrollo (Figura 12 paneles C y E). Además, se aprecia que los músculos de los embriones sobre-expresantes parecen contener un mayor número de núcleos (comparar Figura 12A y 12B y Figura 13). Cuando la sobre-expresión se llevo a cabo utilizando el “driver” *twi*-Gal4 se obtuvieron resultados equivalentes (Figura 12F y 12G). En la Figura 13 se muestra una ampliación de tres segmentos abdominales, A3, A4 y A5 donde se aprecia en mayor detalle la variación aparente en el número de núcleos presentes en las fibras musculares.

A continuación se analizó, siguiendo la misma estrategia, el efecto de la pérdida de función de *Cf2*. Para ello, se analizaron embriones deficientes para *Cf2* utilizando la línea *Df2 γ ²⁷*. Esta línea porta un cromosoma balanceador *CyO*, *wg lacZ* que permite la identificación de los animales homocigóticos como *lacZ* negativos. Tal y como se esperaba, en los animales homocigóticos para la deficiencia de *Cf2* no se observa expresión de esta proteína (Figura 12I). En los embriones heterocigotos para *Df2 γ ²⁷* se observa una clara disminución de los niveles de expresión de *Cf2* (Figura 12H). Llama la atención que los músculos de estos animales, al revés de lo que se observa en el caso de la sobre-expresión, parecen contener un menor número de núcleos que los de los embriones *yw* (comparar Figura 13A y 13B). Como ya se ha mencionado, la deficiencia *Df2 γ ²⁷* cubre varios locus además de *Cf2*. Para comprobar que los fenotipos observados se deben realmente a la falta de función de *Cf2* y no a la de cualquiera de los otros locus, se analizaron las líneas en las que la expresión de *Cf2* es interferida tanto utilizando el “driver” *Mef2* Gal4 como *twist* Gal4 (Figura 12L-O). Como se puede observar, tanto los animales heterocigóticos (Figura 12L y 12N) como los homocigóticos (Figura 12M y O), identificados por no expresar GFP, muestran una clara disminución en los niveles de expresión de *Cf2*. Así mismo, se observa, en los animales homocigóticos para la interferencia, un descenso aparente en el número de núcleos presentes en las fibras musculares comparadas con el control (comparar Figura 13 paneles A, C y D). Tanto los embriones homocigóticos para la deficiencia como los dobles homocigóticos para el “driver” Gal4 y UAS RNAi *Cf2* son letales en larva de tercer estadio (datos no mostrados). Estas observaciones demuestran que los fenotipos observados en los embriones homocigóticos para la deficiencia *Df2 γ ²⁷* son debidos específicamente a la pérdida de función de *Cf2*.

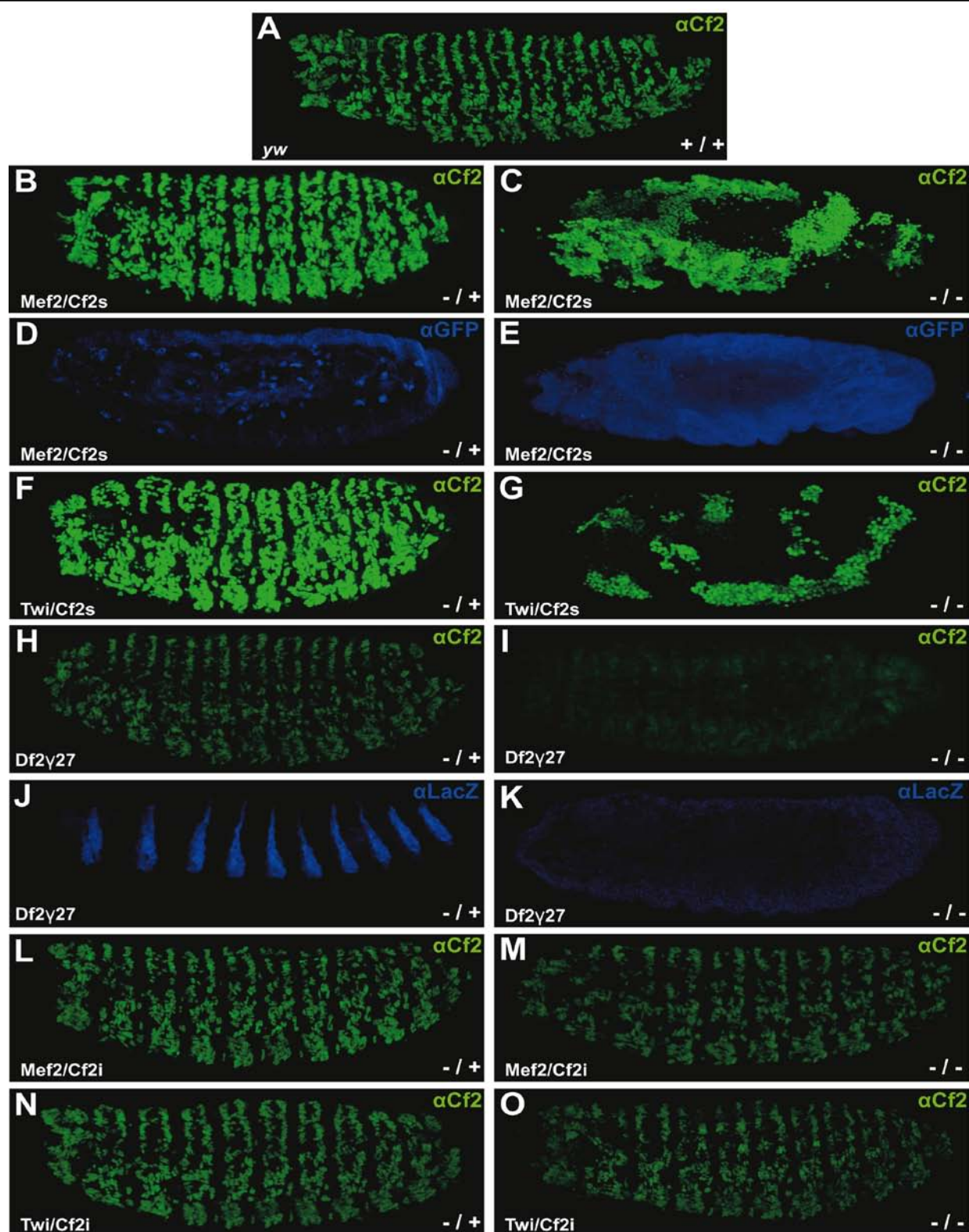
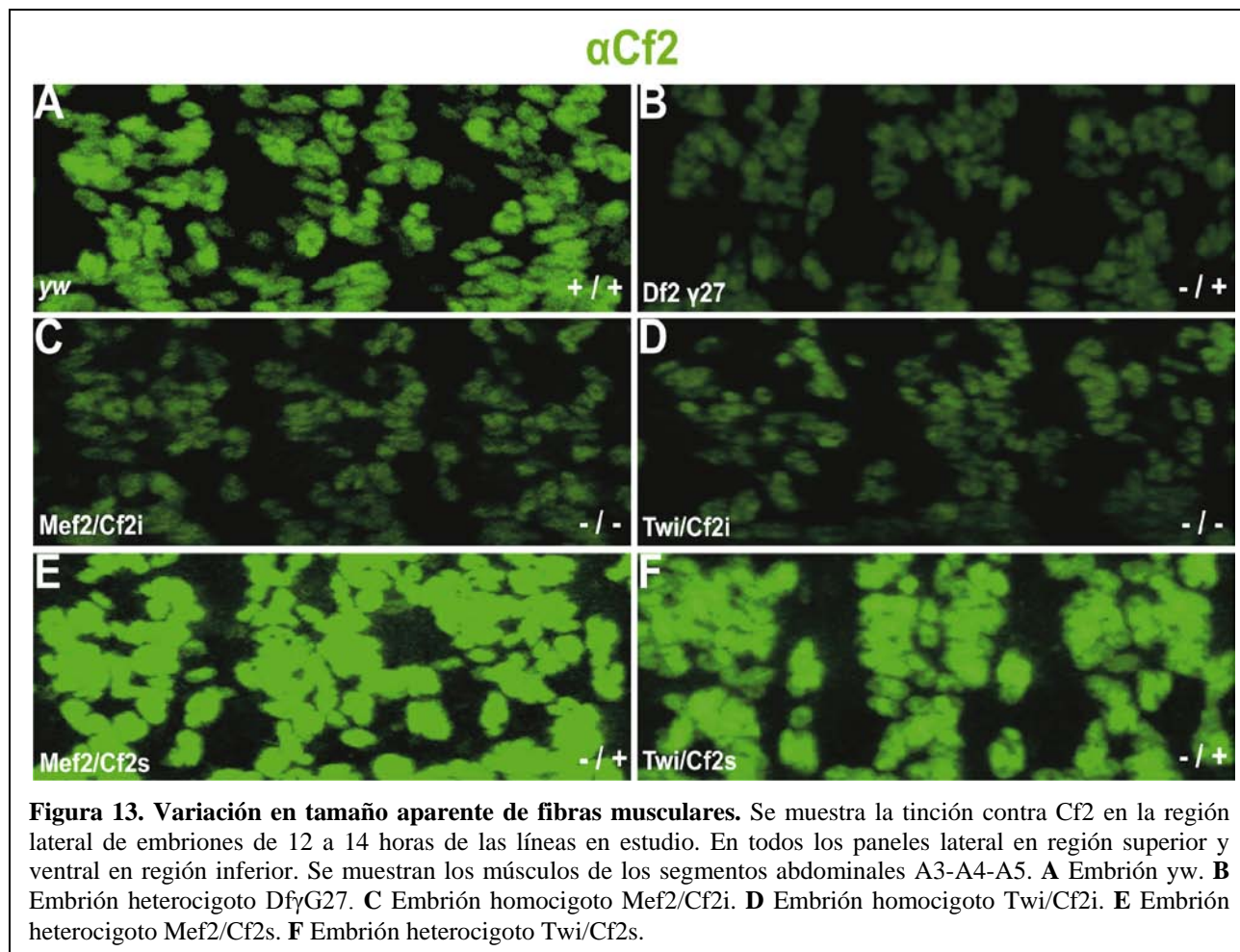


Figura 12. Identificación genotipos en estudio. Se muestran los resultados obtenidos tras tinción contra Cf2 (A-C, F-I, L-O) y contra GFP (D, E) o LacZ (J, K) de las líneas en estudio, que nos permiten identificar los genotipos de los embriones analizados. A Embrión yw. B Embrión heterocigoto Mef2/Cf2s. C Embrión homocigoto Mef2/Cf2s. D Tinción contra GFP en embrión heterocigoto Mef2/Cf2s, el mismo que en B. E Tinción anti GFP embrión homocigoto Mef/Cf2s. F Tinción anti Cf2 embrión heterocigoto Twi/Cf2s. G Tinción anti Cf2 embrión homocigoto Twi/Cf2s. H Tinción anti Cf2 embrión heterocigoto Df2γ27. I Tinción anti Cf2 embrión homocigoto Df2γ27. J Tinción anti LacZ de embrión homocigoto Df2γ27. K Tinción anti LacZ embrión heterocigoto Df2γ27. L Tinción anti Cf2 embrión heterocigoto Mef2/Cf2i. M Tinción anti Cf2 embrión homocigoto Mef2/Cf2i. N Tinción anti Cf2 embrión heterocigoto Twi/Cf2i. O Tinción anti Cf2 embrión homocigoto Twi/Cf2i.

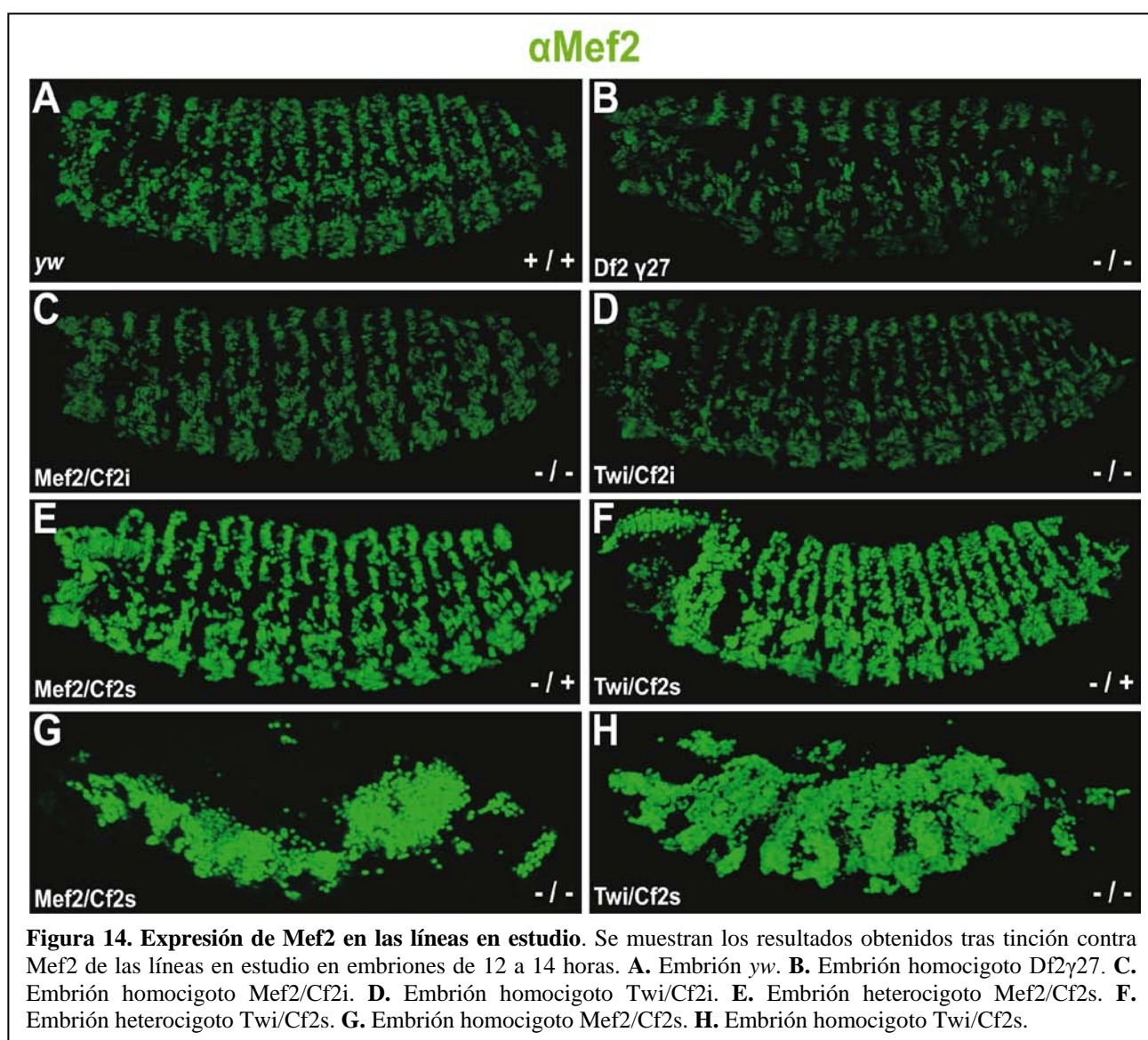


Cf2 modula los niveles de Mef2 durante el desarrollo embrionario.

Una vez determinado que tanto la sobre-expresión como la pérdida de función de Cf2 presentan fenotipos complementarios y habiendo observado lo que parece haber una variación en el tamaño de los músculos somáticos, valorado como número de núcleos por fibra, en respuesta a los diferentes niveles de Cf2, decidimos analizar la expresión de Mef2 en ambas situaciones. El factor de transcripción Mef2 ha sido descrito como el factor de transcripción clave en la diferenciación de la musculatura de *Drosophila*. Los mutantes nulos para *Mef2* carecen de musculatura (Bour et al. 1995; Lilly et al. 1995). Además, ha sido demostrado que la función de este factor de transcripción es dependiente de dosis (Elgar et al. 2008), por lo que es posible que los fenotipos observados se pudieran deber a un descenso en los niveles de expresión de *Mef2*.

En la Figura 14 se muestra la expresión de Mef2 en embriones silvestres, embriones mutantes homocigóticos para *Cf2*, embriones interferidos, así como embriones en los que este factor de transcripción se ha sobre-expresado. Tanto en los animales homocigóticos para la deficiencia *Df2γ²⁷* como para la interferencia de *Cf2*, independientemente del “driver” utilizado, *Mef2*-Gal4 o *twist*-Gal4, se aprecian niveles de expresión de Mef2 claramente inferiores al control *yw* (comparar

Figura 14A con 14B, C y D). Es más, en embriones que sobre-expresan Cf2, utilizando cualquiera de los dos “drivers”, se observa un claro aumento en los niveles de Mef2 (comparar Figura 14A con 14E y 14F). En este sentido es importante destacar que en embriones homocigóticos para los dos “drivers”, se observa la misma desorganización que al teñir con un anticuerpo contra Cf2 confirmando el origen mesodérmico de estas células (Figura 14G y H; comparar con la Figura 12C y 12G). Estos datos sugieren que el niveles de expresión de Mef2 en el desarrollo embrionario de *Drosophila* son dependientes de los niveles de Cf2. Este resultado aun siendo sorprendente, ya que en la literatura se ha descrito a Mef2 como regulador de Cf2 y no al revés, podría tener dos interpretaciones alternativas: (1) Cf2 juega un papel esencial en el mantenimiento de los niveles de expresión transcripcional de *Mef2* o (2) La proteína Cf2 es necesaria para la estabilización de la proteína Mef2, no estando afectada su transcripción. Para poder distinguir entre ambas posibilidades



decidimos analizar los niveles de mensajero de *Cf2* y *Mef2* por RT-PCR cuantitativa tanto en animales deficientes como en embriones que sobre-expresan *Cf2*.

La presencia de marcadores (GFP y LacZ) en los balanceadores de las líneas utilizadas nos permitía genotipar embriones individuales por PCR siguiendo un protocolo recientemente descrito (Ghanim et al. 2006). En la Figura 15 se muestran ejemplos de experimentos típicos de genotipado para identificar embriones homocigóticos para *Df2 γ^{27}* (Figura 15A) o heterocigóticos para las líneas que sobre-expresan *Cf2* (Figura 15B y 15C). Así, la ausencia de *lacZ* y *Cf2* en el panel A indica embriones homocigotos para la deficiencia *Df2 γ^{27}* . Tras identificar por PCR los embriones con el genotipo deseado, los extractos correspondientes a los embriones seleccionados se agruparon de 5 en 5 y el procedió a purificar y retro-transcribir el RNA total. De esta manera, se obtenían los cDNA genotipados para cada línea de nuestro interés. La expresión de *Cf2* y *Mef2* en las líneas en estudio se analizó por PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan (ver Materiales y Métodos) y los resultados se presentan en la Figura 15D. Estos experimentos nos permitían valorar los niveles de sobre-expresión e interferencia alcanzados en las diferentes líneas.

Como era de esperar, en embriones homocigóticos para la deficiencia *Df2 γ^{27}* , y que por tanto carecen del gen *Cf2*, no se observa expresión de este gen (Figura 15D). En consonancia con lo observado en las inmuno-tinciones con el anticuerpo contra *Mef2*, estos animales tienen niveles muy bajos de mensajero de *Mef2* (Figura 15D). De igual forma, los animales en los que se ha interferido la expresión de *Cf2* se observa una fuerte caída en los niveles de mensajero de ambos genes, siendo esta mayor para *Cf2* que para *Mef2*. Se presentan los datos de PCR cuantitativa obtenidos de las líneas en estudio con los dos “drivers”, *Mef2* y *Twist* (Figura 15D). Finalmente, en el caso de la sobre-expresión, se alcanzan niveles de mensajero de *Cf2* entre 4 y 5 veces más altas que en el control *yw* (Figura 15D). En estos animales, los niveles de mRNA de *Mef2* son entre 2 y 2,5 veces mayores que en el control *yw* (Figura 15D). Estos datos confirman que *Cf2* modula la expresión transcripcional de *Mef2*. Podemos afirmar que *Cf2* participa, ya sea directa o indirectamente, en la regulación transcripcional de *Mef2* siendo capaz de modular sus niveles de expresión.

Cf2 participa en el control del número de núcleos por fibra muscular.

En el análisis de los embriones deficientes para *Cf2* se observó que los músculos somáticos eran, aparentemente más pequeños, contienen un menor número de núcleos, que en el control *yw* (Figura 13B). Por otra parte, en los embriones que sobre-expresan *Cf2* se observó el efecto inverso, es decir,

los músculos parecen ser de mayor tamaño (Figura 13E-F). Estos resultados sugerirían que los niveles de Cf2 podrían estar controlando el número de núcleos presentes en cada fibra.

A fin de poder determinar si Cf2 participa en el establecimiento del número total de núcleos por fibra muscular optamos por contar el número de núcleos presentes en un solo músculo en presencia

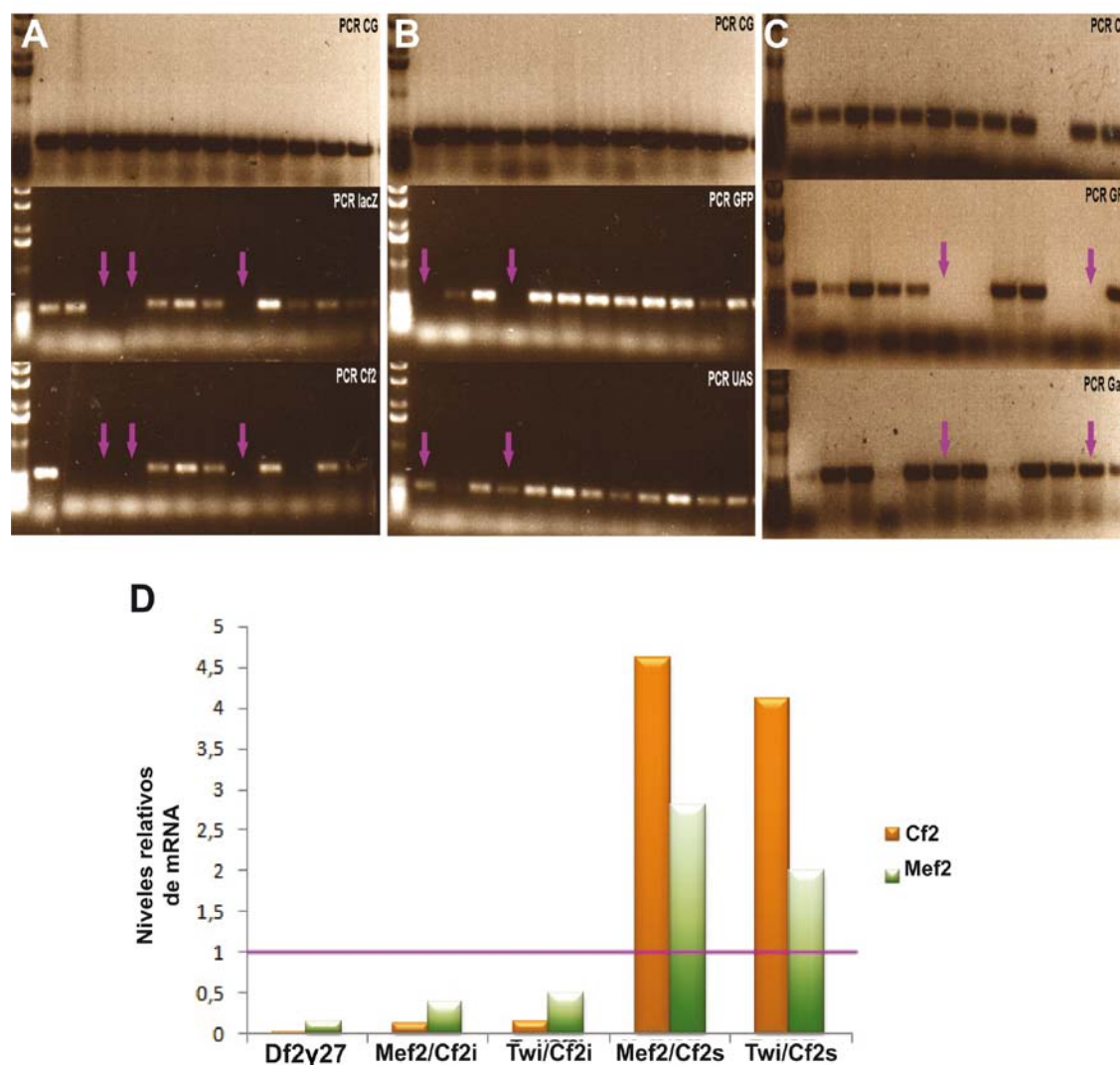


Figura 15. Niveles de mRNA de Cf2 y Mef2 en las líneas en estudio mediante RT PCR Cuantitativa. A, B, C Identificación por PCR del genotipo de embriones individuales. Se indican con flechas embriones homocigotos identificados mediante este ensayo. **A** Resultado obtenido en embriones de la línea *Df2y27*. En el panel superior se muestra el control de PCR para cada embrión. En el panel intermedio se muestra el resultado obtenido con el gen lacZ del balanceador empleado. En el panel inferior se presenta los resultados para el gen Cf2. **B** Genotipado embriones de las líneas con "driver" *twiGal4*. En el panel superior los resultados obtenidos con el control de PCR. En la parte intermedia se muestran los resultados obtenidos con el gen GFP presente en el balanceador de las líneas con "driver" *TwfGal4*. En el panel inferior se muestra el resultado obtenido contra la secuencia UAS presente en las líneas en estudio. **C** Genotipado embriones de las líneas con "driver" *Mef2Gal4*. En el panel superior los resultados del control de PCR. En el panel intermedio se muestran los resultados obtenidos con el gen GFP presente en el balanceador de las líneas con "driver" *Mef2Gal4*. En la parte inferior se muestra el resultado obtenido contra la secuencia Gal4 presente en las líneas en estudio. **D** Niveles relativos de mRNA de Cf2 (Naranja) y Mef2 (verde) para las líneas de la Deficiencia (*Df2y27*), interferencia (*Mef2/Cf2i*, *Twf/Cf2i*) y sobre-expresión (*Mef2/Cf2s*, *Twf/Cf2s*) de Cf2 con respecto a la línea control yw (línea magenta; valor=1).

de mayores o menores niveles de Cf2. Para ello, se procedió a contar los núcleos que en un mismo segmento expresaran un marcador específico de fibra muscular y valorar así el número de núcleos presentes en ese músculo en particular. El gen *eve*, del grupo “pair-rule”, se expresa específicamente en el músculo Dorsal Agudo 1 (DA1). Este gen, *eve*, también se expresa en un grupo de células pericárdicas las cuales, no siendo musculares, no presentan expresión de *Mef2* (Figura 16). En consecuencia, un doble marcaje Eve/Mef2 nos permite identificar de forma inequívoca los núcleos pertenecientes al músculo DA1 y por tanto contabilizarlos con facilidad en los diferentes fondos genéticos utilizados. Los resultados se presentan en la Figura 16.

Se tiñeron con anticuerpos contra Eve y Mef2 embriones yw, deficientes para Cf2 o con su expresión interferida, así como en animales que sobre-expresan este factor de transcripción. Se contaron los núcleos que co-expresan ambos marcadores (Figura 16 y Tabla X). Los músculos DA1 que no expresan Cf2 presentan un número menor de núcleos que los de los animales control (compare Figura 16A – C con 16D – F). Así mismo, en los embriones en los que se ha interferido la función de Cf2 se aprecia lo mismo, aunque el efecto es menor (datos no mostrados; Tabla X). Como era de esperar, en el caso de la sobre-expresión de Cf2 se observa un mayor número de núcleos por músculo DA1 (Figura 16G – I). El número medio de núcleos en el músculo DA1 en animales silvestres es de 13 (Figura. 16 y Tabla X), sin embargo en los embriones que no expresan Cf2 este número es de 8 y en los animales interferidos es de 10-11 mientras que en los animales que sobre-expresan esta proteína es de 16-19 (Tabla X). Como se ha comentado anteriormente, Cf2 modula los niveles de expresión de *Mef2*. Por tanto, la variación en el número de núcleos en respuesta a los diferentes niveles de expresión de Cf2 se podría deber a cambios en los niveles de expresión *Mef2*. Con objeto de explorar esta posibilidad, decidimos analizar el número de núcleos en los músculos DA1 de embriones que sobre-expresan *Mef2* bajo el control del mismo “driver” *Mef2*-Gal4 empleado para sobre-expresar Cf2. Como se muestra en la Figura 16 J-L y en la tabla X, los músculos DA1 de estos animales presentan un número normal de núcleos. Estos resultados confirman que Cf2 participa directamente en el control del número de núcleos por fibra y que esta participación es independiente de su papel como modulador de la expresión de *Mef2*.

La alteración de los niveles de expresión de Cf2 produce alteraciones en el patrón muscular embrionario.

Recientemente se ha demostrado que Cf2 participa en la regulación transcripcional de las proteínas sarcoméricas y que los mutantes hipomorfos para Cf2 muestran anomalías musculares estructurales y funcionales (García-Zaragoza et al. 2008). Es más, Cf2, junto a Mef2, es capaz de

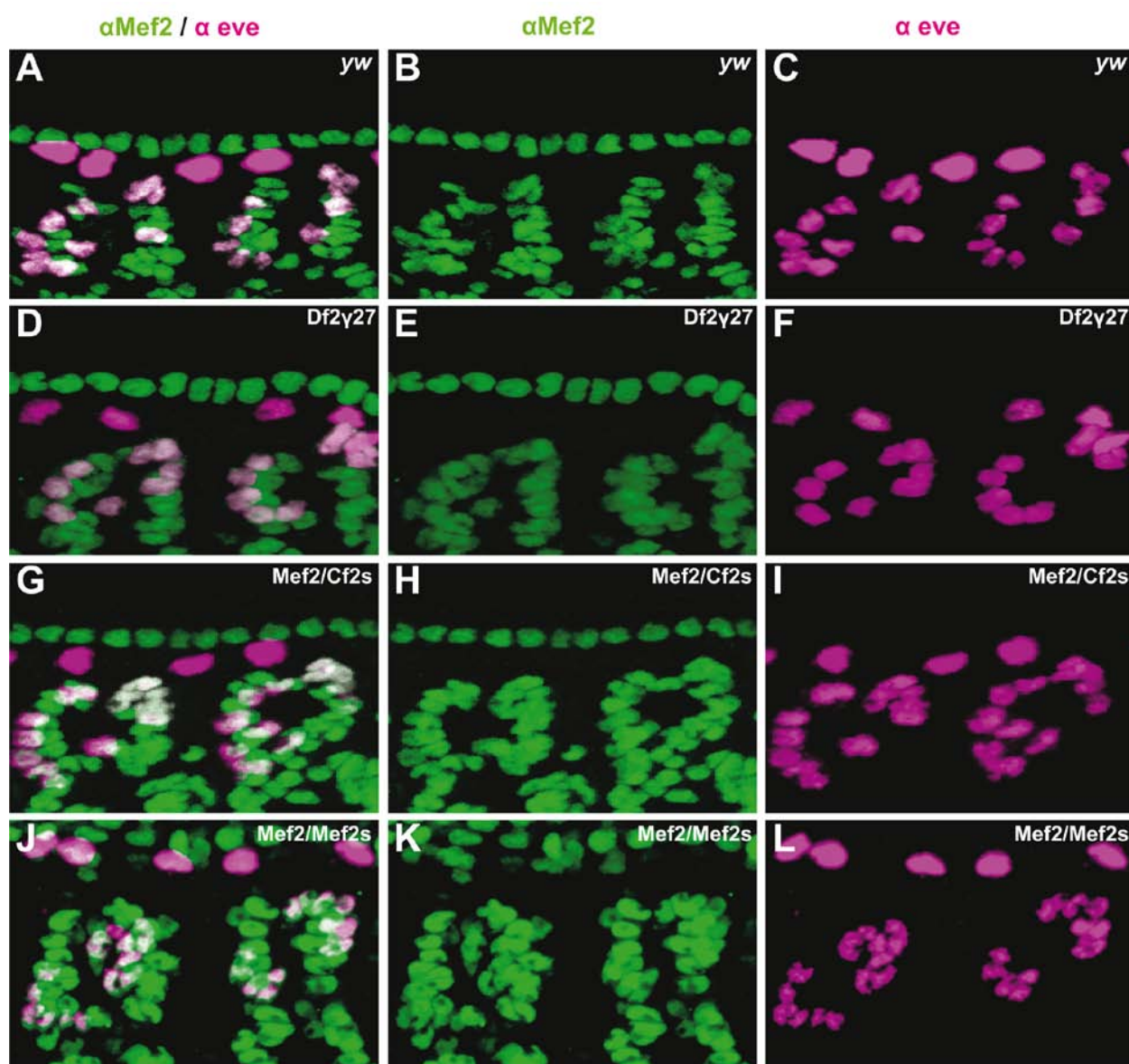


Figura 16. Cf2 y los músculos somáticos. Determinación del número de núcleos en músculo Dorsal Agudo 1 (DA1). Se muestra la superposición de tinciones anti Mef2 y anti Eve (A, D, G, J) así como las tinciones individuales anti Mef2 (B, E, H, K) y anti Eve (C, F, I, L), en región dorsal de hemisegmentos de embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio Df2γ27, Mef2/Cf2s y Mef2/Mef2s. A, B, C Embrión yw. D, E, F Embrión homocigoto Df2γ27. G, H, I Embrión heterocigoto Mef2/Cf2s. J, K, L Embrión heterocigoto Mef2/Mef2s.

Genotipo	Nº Núcleos mef2(+);eve(+)
yw	13 ± 1,6 (n=20)
Df2γ27	8 ± 1,8 (n=16)
Mef2/Cf2i	10 ± 1,8 (n=21)
Twf/Cf2i	11 ± 2 (n=18)
Mef2/Cf2s	19 ± 1,2 (n=25)
Twf/Cf2s	16 ± 2,1 (n=20)
Mef2/Mef2s	13 ± 2 (n=15)

Tabla X. Número medio de núcleos en músculo dorsal DA1 en embriones en etapa 17. Entre paréntesis se indica el número de hemisegmentos afectados analizados.

inducir la expresión ectópica de proteínas sarcoméricas en tejido nervioso (Tanaka et al. 2008). Finalmente, como se muestra en el apartado anterior, los niveles de Cf2 juegan un papel importante en el control del número de células que se fusionan para dar lugar al músculo diferenciado. La participación de Cf2 en este proceso parece ser independiente de Mef2. A la vista de estos datos, nos planteamos si Cf2 juega un papel más relevante en la diferenciación muscular del que inicialmente se pensaba. Y lo que es más importante, si este es podría ser, al menos parcialmente, independiente de Mef2.

Como se muestra en la Figura 17, el patrón muscular segmental del embrión de *Drosophila* es extraordinariamente ordenado, lo que hace bastante sencilla la detección de anomalías en su organización. Decidimos por tanto, estudiar si la pérdida, total o parcial, o la ganancia de función de Cf2 producía alteraciones en el patrón muscular embrionario. Para ello se realizaron tinciones con anticuerpos contra la cadena pesada de la Miosina (MyHC) o la Troponina T (TnT) en los diferentes fondos genéticos. Las tinciones contra estas proteínas nos permiten marcar con claridad todos los músculos, lo que facilita la identificación de defectos en el patrón muscular. En la Figura 17 se muestran los datos obtenidos para la tinción contra MyHC.

En consonancia con lo que ha sido descrito con anterioridad, observamos una variación clara de los niveles de MyHC y TnT paralela a la variación en la expresión de Cf2 (Figura 17 y datos no mostrados). Tanto los embriones homocigóticos para la interferencia de Cf2 con ambos “drivers”, *mef2* y *twist*, que se presentan en la Figura 17C y D como para la deficiencia *Df2^{γ27}* (datos no mostrados) presentan un claro descenso en los niveles de expresión de MyHC y TnT (comparar Figura 17A y B con Figura 17C y D). Los embriones que sobre-expresan Cf2 muestran, por el contrario, niveles de expresión más elevados que el control (Figura 17E y F). Sorprendentemente estos embriones, presentan con frecuencia músculos adicionales, como por ejemplo la duplicación de los músculos laterales (Figura 17F, flecha), y/o alteraciones en el tamaño y morfología de diversos paquetes musculares, como es el caso del músculo DA3 que se muestra en la Figura 17E (flechas). Este músculo conserva su anclajes pero presenta una morfología más similar a otros músculos de su entorno como el DA2. Como era de esperar, en el caso de la pérdida total o parcial de Cf2 obtuvimos resultados opuestos. En estos embriones se observa la pérdida de paquetes musculares completos, en la Figura 17C se muestra la pérdida del músculo LL4, que en el caso de la sobre-expresión de Cf2 se encuentra duplicado (Figura. 17F).

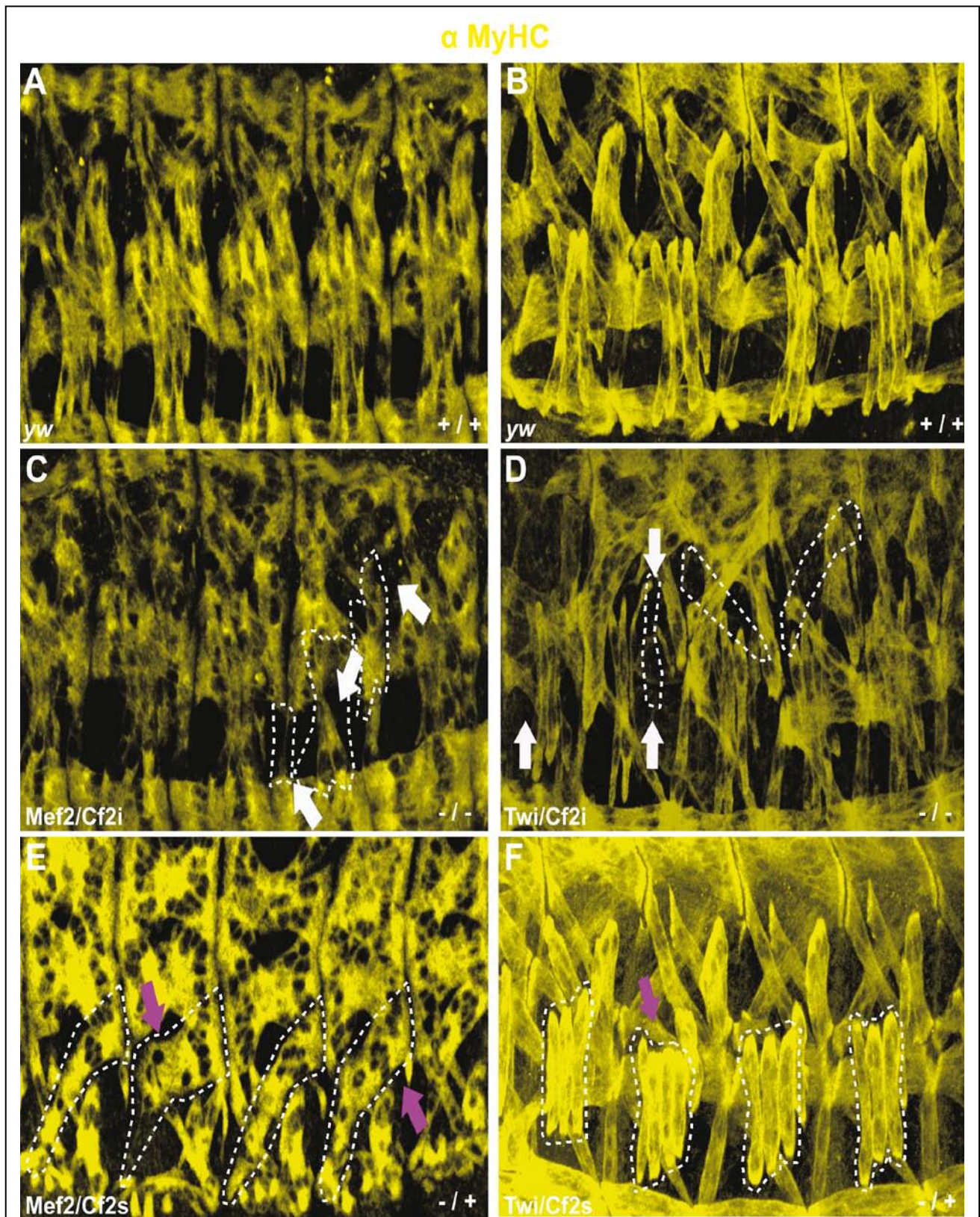


Figura 17. Cf2 y los músculos somáticos. Tinción anti MyHC en embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. En todos los paneles región Dorsal hacia región superior y Ventral hacia región inferior. **A, B** Tinción en embriones control *yw*. **C, D** Músculos laterales de embriones homocigotos *Mef2/Cf2i* (**C**) y *Twi/Cf2i* (**D**). **E** Segmentos abdominales de embrión de la línea de sobre-expresión *Mef2/Cf2s*. Se muestra el Músculo Dorsal DA3 en varios segmentos. **F** Músculos de región lateral de embrión de la línea de sobre-expresión *Twi/Cf2s*. La pérdida de fibras musculares se indica con una flecha blanca (**C, D**) mientras que las alteraciones en la morfología de la fibra y la aparición de fibras adicionales se indican con una flecha magenta (**E, F**).

Variaciones en los niveles de expresión de Cf2 inducen variaciones el número de cardiomiocitos presentes en corazón de *Drosophila*.

Los efectos de la pérdida o ganancia de función de Cf2 en la musculatura somática embrionaria parecen sugerir que esta proteína juega un papel importante en la determinación y diferenciación de los precursores musculares. El corazón de *Drosophila* está formado por 104 cardiomiocitos alineados en dos hileras y divididos segmentalmente. Cada hemisegmento, entre los segmentos T3-A7, cuenta con 6 cardioblastos. En la mayor parte de los hemisegmentos, las dos células anteriores forman las válvulas u ostias y expresan *seven up* (*svp*) (ver Figura 6).

Las 4 células posteriores son contráctiles y expresan el factor de transcripción Tinman (Tin) (Figura 6). Cada una de estas células se determina en los estadios iniciales de la diferenciación cardíaca. Estas células diferenciarán dando lugar cada una a un cardiomiocito que no se fusiona con otros durante este proceso. A diferencia de las células musculares somáticas que son células pluri-nucleares, los cardiomiocitos son células mono-nucleadas. Es decir, el número de total de cardiomiocitos es reflejo del número de células que fueron especificadas como tales en las primeras fases de la diferenciación cardíaca (Ward et al. 2000; Bryantsev et al. 2009). Así pues, se podría considerar que cada cardiomiocito es su propio precursor. Si realmente los niveles de Cf2 juegan un papel importante en la determinación de los precursores musculares, es muy posible que también lo hagan en la determinación de los precursores cardíacos. En este caso la sobre-expresión o pérdida de Cf2 debería de producir un incremento o descenso en el número de cardiomiocitos presentes en el corazón diferenciado.

Se realizaron tinciones en embriones de los diferentes genotipos con un anticuerpo contra Mef2 y se examinaron sus conductos dorsales, es decir el corazón en *Drosophila*. Los animales carentes de Cf2, homocigotos para la deficiencia $Df2\gamma^{27}$, muestran un menor número de cardiomiocitos en sus corazones (Figura 18, comparar paneles 18A y C). Las flechas muestran lugares en donde aparecen huecos por la falta de células. Es más, esta falta de cardiomiocitos también se observa en aquellos animales en los que la expresión de Cf2 ha sido interferida, confirmando la especificidad del fenotipo (Figura 18D y E). Los animales interferidos presentan un descenso en el número de cardiomiocitos menor que los embriones nulos para Cf2. Esto no es sorprendente ya que como se muestra en la Figura 6 los embriones homocigotos para la interferencia expresan niveles significativos, aunque muy bajos, de Cf2. En consonancia con este efecto dependiente de dosis, los embriones heterocigotos para la deficiencia muestran una falta moderada de cardiomiocitos (datos no mostrados). Cuando se analizaron los embriones que sobre-expresan Cf2, se observaron

anomalías morfológicas más acusadas (Figura 18, comparar 18A con 18F y G). En numerosos segmentos se aprecian fenómenos de hiperplasia, llegando a aparecer segmentos con 3 filas de cardioblastos (flechas en Figura 18F y 18G). También aparecen cardioblastos adicionales aislados o en grupos de dos. Estos datos se resumen en la tabla XI. Analizados en conjunto estos resultados sugieren que, al igual que en el caso de la musculatura somática, es necesario un control estricto de los niveles de Cf2 para que se produzca la diferenciación del número correcto de cardiomiocitos.

. Como ya se ha comentado, la variación en los niveles de expresión de Cf2 provoca una variación paralela en los niveles de Mef2. Dado que Mef2 juega un papel fundamental en el proceso de diferenciación muscular (Lilly et al. 1994; Nguyen et al. 1994; Bour et al. 1995; Black et al. 1998), cabe la posibilidad de que los fenotipos observados sean un efecto indirecto derivado de la variación en los niveles de Mef2. Con objeto de descartar esta posibilidad se realizaron tinciones en embriones en los que se sobre-expresó Mef2 con el “driver” *Mef2-Gal4*, el mismo que se empleó para sobre-expresar Cf2. Como se puede observar en la Figura 18B (comparar con 18A) el número de cardiomiocitos en estos embriones es normal, no observándose desorganización alguna en el corazón. Sin embargo, en estos embriones aparece un alto número de núcleos Mef2 positivos en las proximidades del corazón, rodeando el corazón en regiones más laterales y ventrales o un poco por debajo del conducto dorsal.

Con objeto de determinar si estos núcleos extra son o no cardiomiocitos, decidimos comprobar si se localizaban dentro o fuera de la región determinada por la Pericardina (Prc). Pericardina es una proteína extracelular secretada por las células pericárdicas y que delimita la región ocupada por los cardiomiocitos (Chartier et al. 2002; Ponzielli et al. 2002; Monier et al. 2007). También se analizó si estos núcleos expresan Tin, lo que confirmaría si son o no cardiomiocitos funcionales. Este último aspecto ya ha sido demostrado en estudios de sobre-expresión de Mef2 en los que se ha descrito que estos núcleos adicionales no expresan Tin por lo que no deben ser cardioblastos funcionales (Chartier et al. 2002). Los resultados obtenidos de este experimento se muestran en la Figura 19. Como se aprecia en esta Figura, en la región que ocupan los núcleos Mef2⁺ adicionales no se detecta señal Tin (Figura 19D-F). Además, esta región se encuentra fuera del dominio delimitado por la Pericardina. Estas células adicionales no son por tanto cardioblastos deslocalizados, confirmando que Cf2 ejerce un papel independiente de Mef2 en el proceso de diferenciación de los cardiomiocitos. Sorprendentemente, en estos embriones aparecen células Tin⁺ en regiones muy alejadas del conducto dorsal, en posición lateral. Estas células Tin⁺ se encuentran recubiertas por Prc. Aunque no podemos determinar la naturaleza de estas células adicionales con

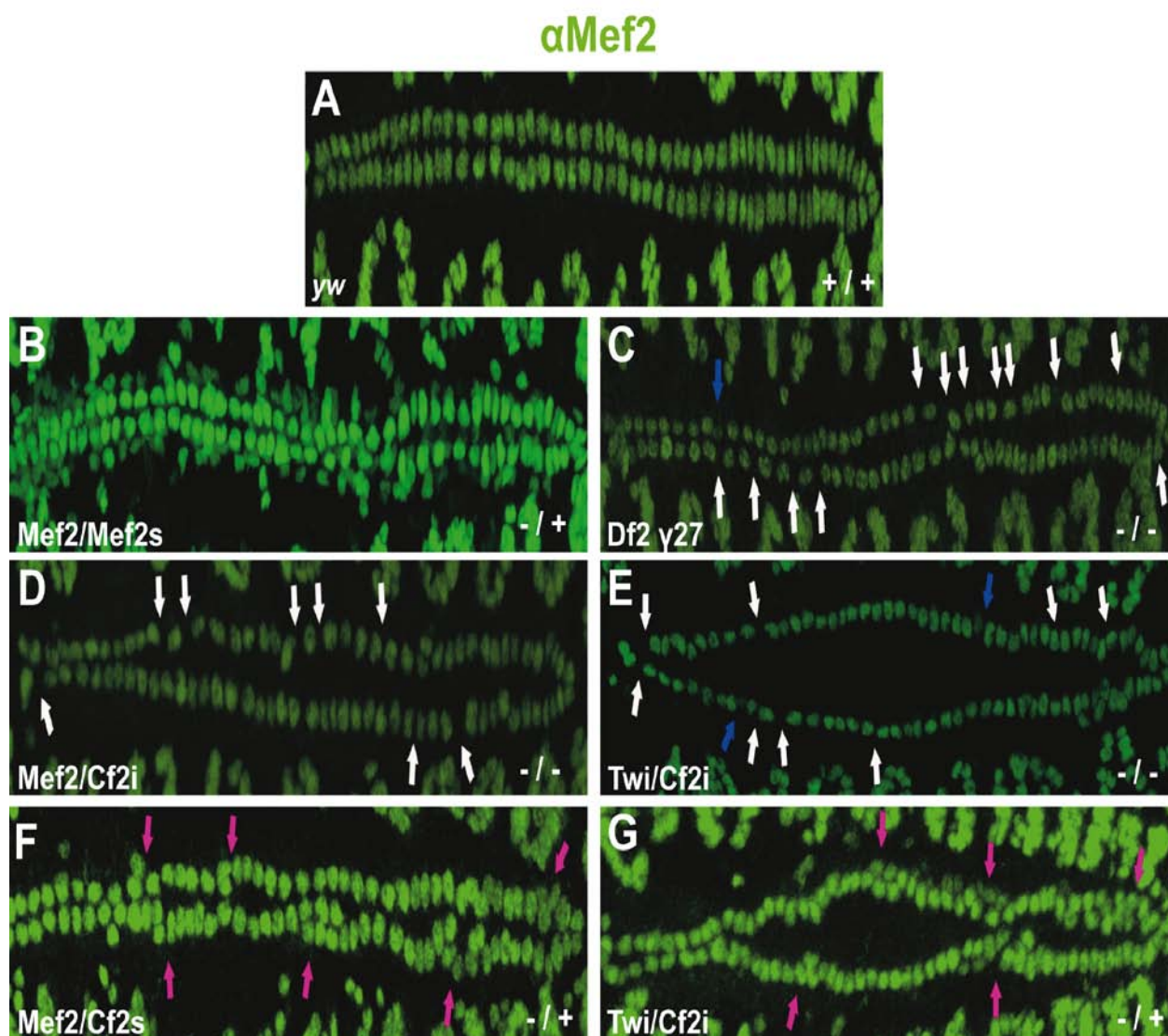


Figura 18. Cf2 modula el número de cardioblastos. Se muestra la tinción anti Mef2 en región dorsal de embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. **A** Embrión *yw*. **B** Embrión heterocigoto *Mef2/Mef2s*. **C** Embrión homocigoto *Df2 γ 27*. **D** Embrión homocigoto *Mef2/Cf2i*. **E** Embrión homocigoto *Twil/Cf2i*. **F** Embrión heterocigoto *Mef2/Cf2s*. **G** Embrión heterocigoto *Twil/Cf2s*. Las flechas blancas indican zonas con disminución en el número de cardioblastos y la presencia de cardioblastos con niveles reducidos de expresión de Mef2 se indican con flechas azules (**C**, **D**, **E**). Las flechas magenta indican zonas con aumento en el número de cardioblastos (**F**, **G**).

Genotipo	Nº Núcleos <i>mef2</i> (+)
<i>yw</i>	104 \pm 0 (n=15)
<i>Df2γ27</i>	88 \pm 2,6 (n=16)
<i>Mef2/Cf2i</i>	93 \pm 4,8 (n=15)
<i>Twil/Cf2i</i>	96 \pm 4 (n=18)
<i>Mef2/Cf2s</i>	115 \pm 3,5 (n=17)
<i>Twil/Cf2s</i>	112 \pm 4 (n=15)

Tabla XI. Número medio de cardioblastos en conducto dorsal de embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. Entre paréntesis se indica el número de embriones analizados.

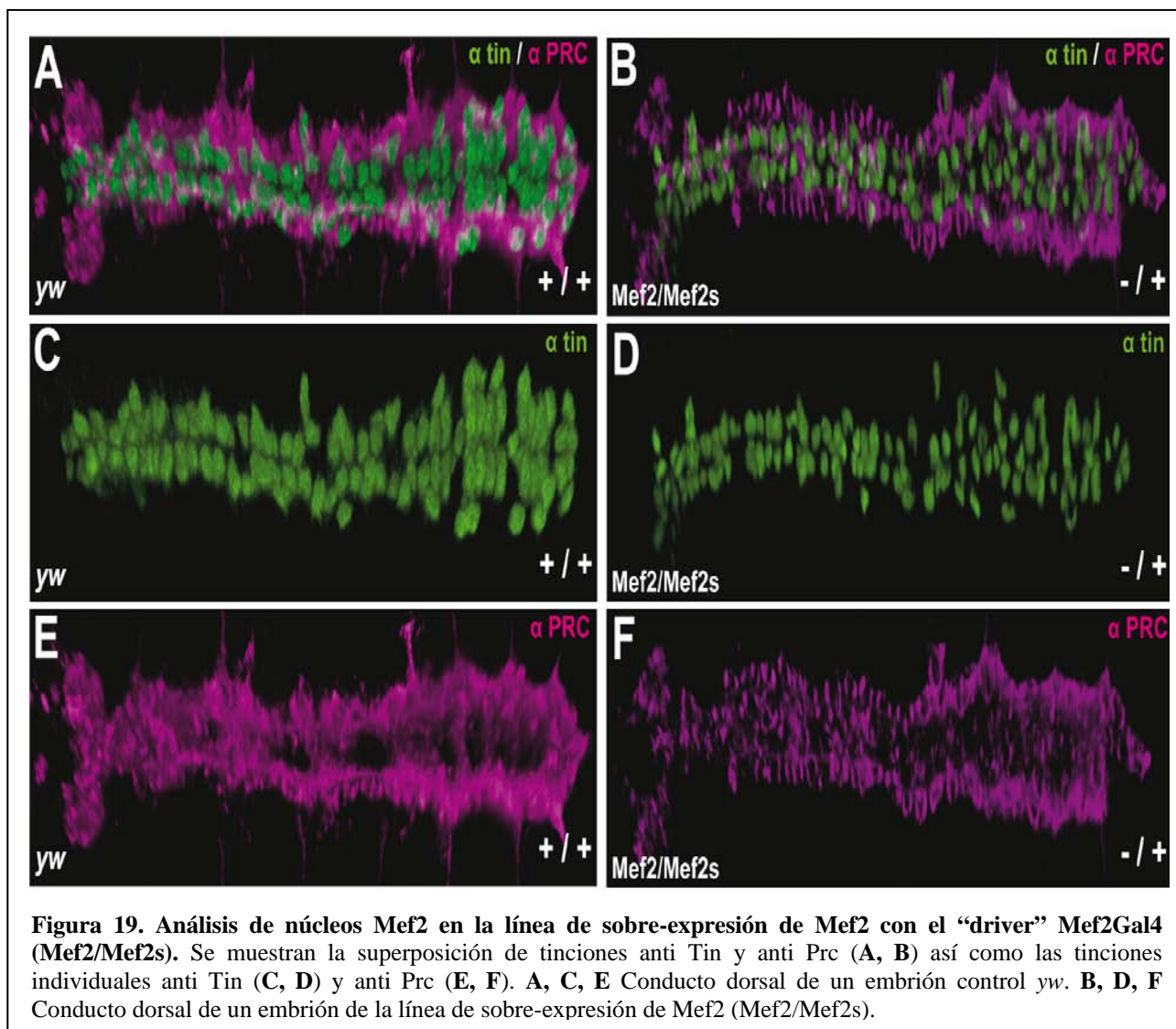
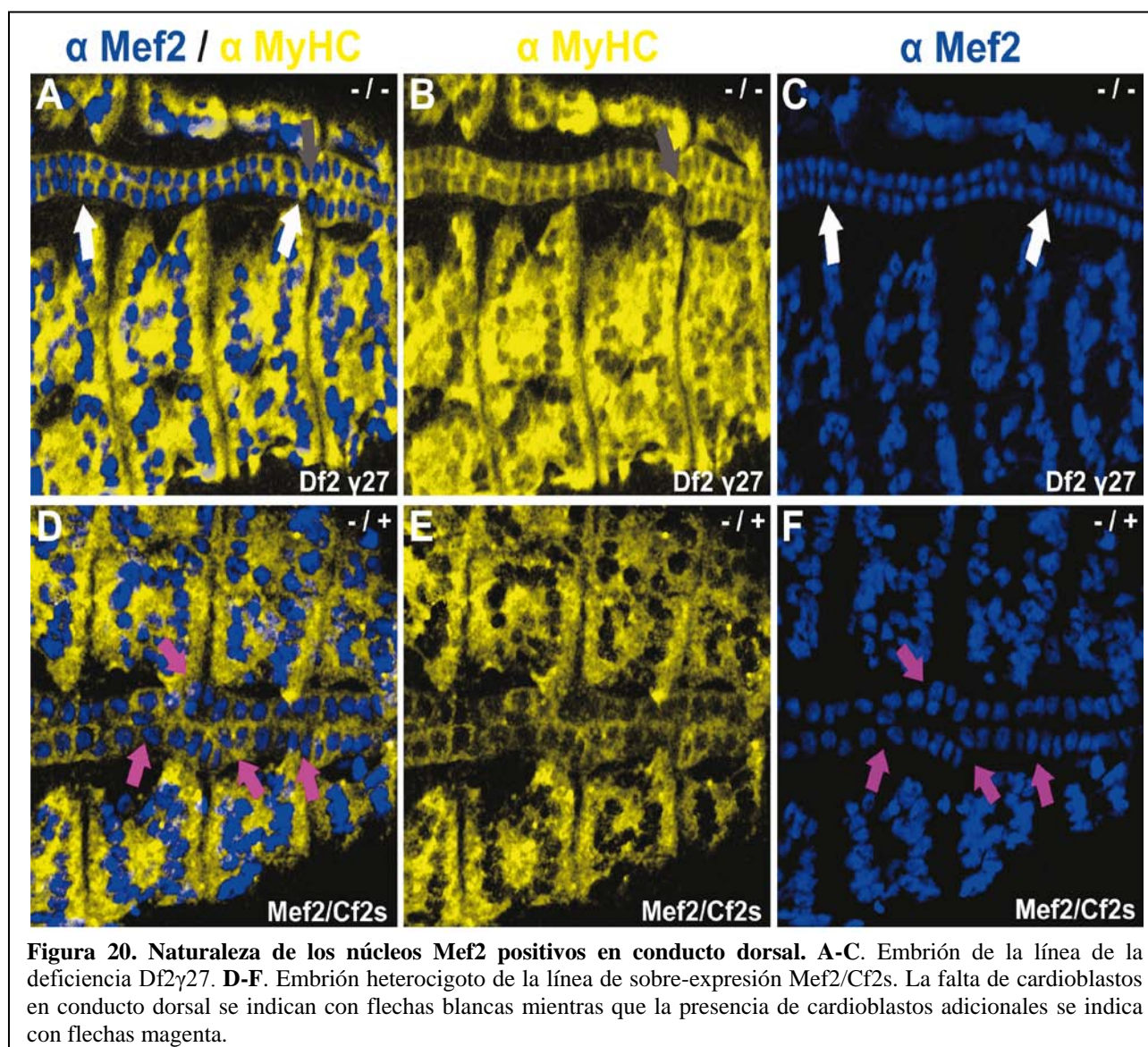


Figura 19. Análisis de núcleos Mef2 en la línea de sobre-expresión de Mef2 con el “driver” Mef2Gal4 (Mef2/Mef2s). Se muestran la superposición de tinciones anti Tin y anti Prc (A, B) así como las tinciones individuales anti Tin (C, D) y anti Prc (E, F). A, C, E Conducto dorsal de un embrión control *yw*. B, D, F Conducto dorsal de un embrión de la línea de sobre-expresión de Mef2 (Mef2/Mef2s).

exactitud, lo más probable es que estas células sean células pericárdicas ya que no parecen expresar Mef2 y si parecen segregar pericardina.

Para comprobar que los núcleos Mef2 positivos que apreciamos en las líneas que sobre-expresan Cf2 era cardioblastos funcionales, realizamos co-tinciones con anticuerpos contra las proteínas Mef2 y MyHC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20. Como se puede apreciar, todos los núcleos Mef2 positivos que aparecen en el conducto dorsal expresan MyHC, por lo que podemos concluir que se trata de células musculares funcionales, lo que las confirma como cardiomiocitos funcionales. Cuando llevamos a cabo el mismo tipo de análisis en las líneas con pérdida de función de Cf2 observamos que generalmente la falta de cardiomiocitos a lo largo del conducto dorsal es compensada por la presencia de células de mayor tamaño, como demuestra la tinción con anti-MyHC (Figura 20A-C). Sorprendentemente, algunos de los núcleos Mef2 positivos de estos embriones no expresan MyHC, lo que sugiere que la anomalías morfológicas observadas en el conducto dorsal de animales carentes de Cf2, o con su expresión muy disminuida, son más



acusadas de lo que se pensó inicialmente. No solo disminuye el número de núcleos sino que algunos de los que expresan Mef2 no expresan proteínas musculares estructurales por lo que han de carecer de capacidad contráctil.

Las variaciones en los niveles de Cf2 se reflejan en todos los linajes de cardioblastos.

Como ya se ha mencionado, el corazón de *Drosophila* presenta seis cardiomiocitos por hemisegmento entre los segmentos T3 y A7. Estas seis células tienen funciones diferentes, las 2 anteriores forman el equivalente a lo que serían “válvulas cardíacas”, unas estructuras denominadas ostias. Las cuatro posteriores son células musculares propiamente dichas y son las responsables de la contractibilidad del corazón. Esta diferencia funcional se ve reflejada a nivel de expresión génica; Las células más anteriores expresan *syp* mientras que las cuatro más posteriores expresan *tin*. Dado que Cf2 participa en la especificación del número de cardioblastos presentes en el corazón, no

planteamos si esta participación se reduciría solo a uno de los dos linajes o si sería general, afectando a todo el corazón. En un intento de contestar a esta pregunta decidimos analizar la expresión conjunta de *Mef2*, expresado por todos los cardiomiocitos, es decir en los seis de cada hemisegmento y *Svp*, expresado solo por las células de las ostias, en los diferentes fondos genéticos analizados. Todos aquellos cardioblastos que expresen *Mef2* y no expresen *Svp* son cardioblastos Tin positivos (ver Figura 6; Lo et al. 2003; Monier et al. 2007; Potthoff et al. 2007).

Como se aprecia en la Figura 21, las variaciones en los niveles de *Cf2* producen alteraciones en el número de ambos tipos de cardioblastos, si bien los Tin positivos son los que se modifican en un mayor número de casos. Aunque siempre en menor medida que los Tin positivos, el número de cardioblastos *Svp* positivos también experimentan alteraciones en algunos segmentos.

Como ya se ha comentado, la pérdida de función de *Cf2* produce una reducción en el número total de cardioblastos del conducto dorsal. Esta reducción se observa en ambos linajes de cardioblastos, tanto Tin+ como *Svp*+, aunque en estos últimos se produce con una menor frecuencia. En todos los embriones analizados, se aprecia una disminución en el número de cardioblastos Tin+ mientras que solo en 1 de cada 4 embriones se observa una reducción en el número de cardioblastos *Svp*+ (Figura 21D a F y Tabla XII). En ningún caso se detectan hemisegmentos con menos de dos cardioblastos Tin+, es más, en todos los embriones el número total de cardioblastos se mantiene por debajo de los 104 que se observan en los embriones silvestres. Cuando se analizaron embriones en los que la expresión de *Cf2* había sido interferida se obtuvo el mismo resultado, confirmando que la reducción en el número de cardioblastos se debe a la pérdida de función de *Cf2* (Figura 21G a L y Tabla XII).

Cuando se analizaron embriones que sobre-expresan *Cf2* se observó un incremento general en el número de cardioblastos, estando siempre el número total de cardioblastos por encima de los 104. La sobre-expresión de *Cf2* afecta a los cardioblastos Tin+ en todos los segmentos del conducto dorsal (del T3 al A8) de forma heterogénea, habiendo por término medio 1,2 cardioblastos adicionales por hemisegmento (Figura 21M a R). Además el aumento en los niveles de *Cf2* provoca que, en algunos casos, aparezca una pareja de cardioblastos *Svp*+ en los dos segmentos más anteriores del corazón, donde en condiciones normales, no se expresa *svp*. Podemos considerar que esta pareja de cardioblastos son células adicionales ya que el segmento en el que aparece tiene un número igual o superior de estas células respecto a la línea control *yw*. En general, se observa con mayor frecuencia un incremento en el número de cardioblastos *Svp*+ en los segmentos A2 y A7 (Figura 21M a R y Tabla XII).

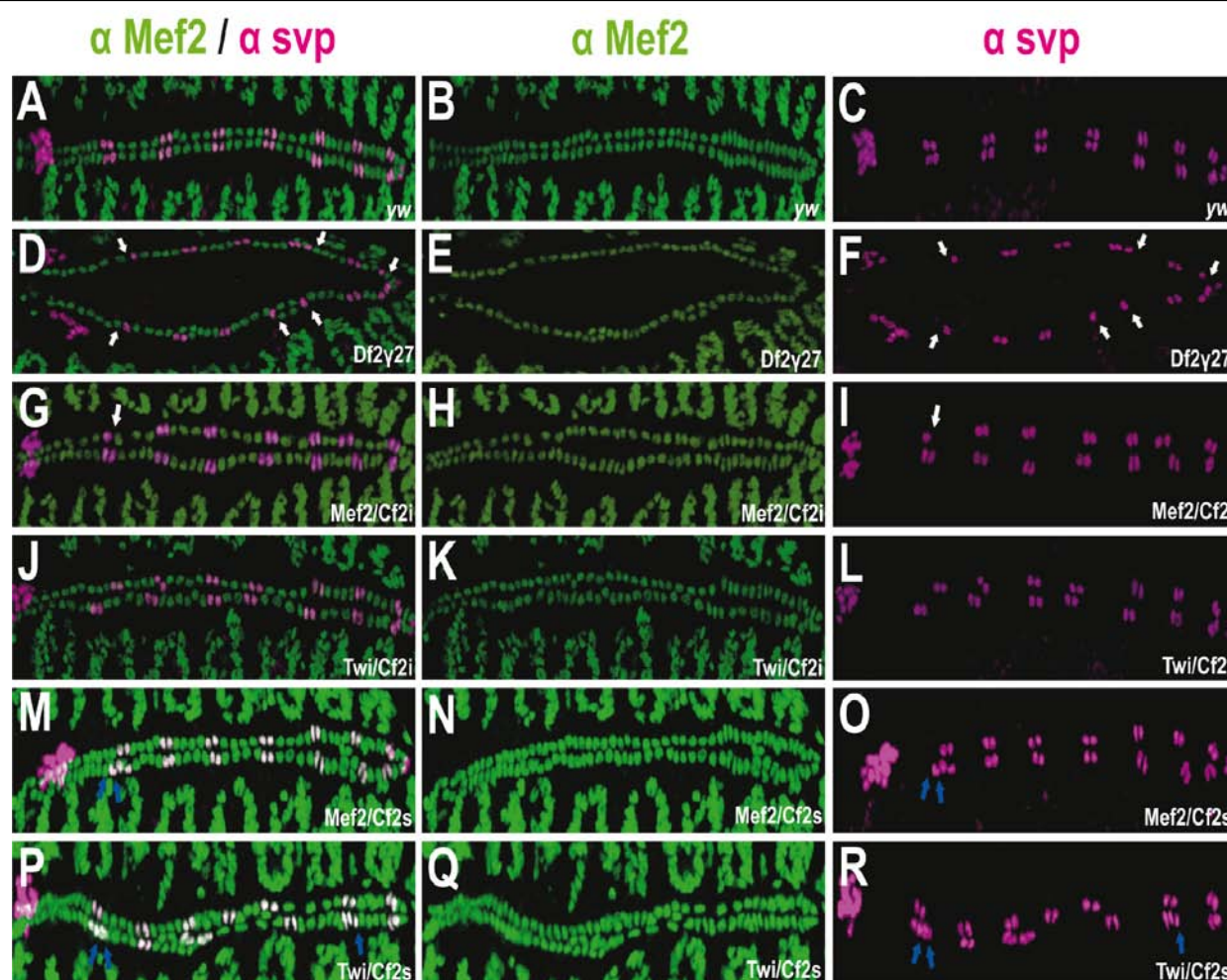


Figura 21. Efecto de Cf2 sobre los linajes de cardioblastos. Se muestra la superposición de las tinciones anti Mef2 y anti Svp (A, D, G, J, M, P) y las tinciones individuales anti Mef2 (B, E, H, K, N, Q) y anti eve (C, F, I, L, O, R) en región dorsal de embriones de 12 a 14 horas, de las líneas en estudio. A, B, C Embrión yw. D, E, F Embrión homocigoto Df2y27. G, H, I Embrión homocigoto Mef2/Cf2i. J, K, L Embrión homocigoto Twil/Cf2i. M, N, O Embrión heterocigoto Mef2/Cf2s. P, Q, R Embrión heterocigoto Twil/Cf2s. La falta de cardioblastos svp se indica con flechas blancas, mientras que la presencia de cardioblastos svp adicionales se indica con flechas azules.

Cf2 participa en la determinación de los diferentes linajes de células pericárdicas.

La implicación de Cf2 en la determinación de los diferentes linajes de cardioblastos podría indicar que Cf2 participa en las primeras etapas de este proceso. En las primeras etapas del desarrollo del corazón de *Drosophila* se especifica un grupo de células en cada segmento que mantiene la expresión de *tin* y dará lugar a todas las células del corazón, tanto cardiomiocitos como células pericárdicas (Chartier et al. 2002; Ponzielli et al. 2002; Monier et al. 2007).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que Cf2 juega un papel importante en las primeras etapas de la determinación de los cardiomiocitos. Es más, esta función es independiente, al menos en parte, de Mef2. En este contexto, nos planteamos si Cf2 podría participar en la especificación de todo el linaje cardíaco, es decir en la especificación de los cardioblastos y también

Genotipo	Nº Núcleos tin(+)	Nº Núcleos svp(+)	Nº Embriones analizados
<i>yw</i>	76 ± 0	28 ± 0	10
<i>Df2Y27</i>	68 ± 4	23,2 ± 4,6	12
<i>Mef2/Cf2i</i>	70 ± 4,8	25,6 ± 2	11
<i>Twil/Cf2i</i>	73 ± 3	25,3 ± 2,3	10
<i>Mef2/Cf2s</i>	82 ± 3	31 ± 3	10
<i>Twil/Cf2s</i>	80 ± 4,6	30,2 ± 1,8	12

Tabla XII. Número medio de cardioblastos tin y svp positivos en el conducto dorsal en embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. Se indica también el número de embriones analizados.

de las células pericárdicas, y no solo en la de las células musculares (cardioblastos) del mismo. De ser así, el número de células pericárdicas debería verse alterado en caso de pérdida de función de Cf2. En el caso de la sobre-expresión de Cf2 esperaríamos observar alteraciones inversas a las producidas por su falta.

Las células pericárdicas se sitúan alrededor del conducto dorsal y su función no es del todo conocida aunque podrían tener un papel importante en el mantenimiento del flujo y la contracción cardiaca ver introducción y Figura 6 (Fujioka et al. 2005; Johnson et al. 2007). Estudios recientes han demostrado que las células pericárdicas participan en procesos de de-toxificación pero que no son necesarias para que el corazón larvario funcione correctamente ni para el desarrollo del corazón adulto (Debjani Das 2008).

Como ya se ha comentado, la Pericardina es una proteína de matriz extracelular secretada por las células pericárdicas a las que rodea a lo largo de la aorta posterior y el corazón embrionario. Prc se concentra en la superficie de los cardioblastos no apareciendo nunca en el lumen del conducto dorsal. Así, esta proteína separa físicamente los dos linajes cardiacos, cardiomiocitos y células pericárdicas, situándose las primeras en el interior del área delimitada por esta proteína extracelular.

La Prc también se observa en las Glándulas Anillo (Ring Glands) (Chartier et al. 2002). Estudios previos sugieren que esta proteína promueve la migración y alineamiento de las células del corazón (Chartier et al. 2002). En embriones en los que el gen *prc* se ha silenciado por RNAi el epitelio cardiaco se desorganiza durante su migración hacia la línea dorsal (Chartier et al. 2002). En estos embriones al final del desarrollo embrionario se aprecia que cardiomiocitos y células pericárdicas están desalineados apareciendo agrupaciones de ambos tipos celulares (Chartier et al. 2002).

La distribución de la Prc separando los dos linajes celulares cardiacos en el corazón embrionario desarrollado y su función durante el desarrollo del mismo hace de la Prc un buen marcador para

investigar la participación de Cf2 en la especificación de todo el linaje cardiaco y no solo en sus células musculares.

Se realizaron tinciones dobles contra Pericardina y Mef2 en embriones de las diferentes líneas deficientes y transgénicas en estudio. Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Figura 22. La disminución de los niveles de Cf2 se traduce en un aumento generalizado de la expresión de Pericardina. Este aumento es especialmente evidente en la región anterior de la aorta. Tanto en los animales homocigóticos para la deficiencia $Df2\gamma^{27}$ como en aquellos en los que su expresión se ha interferido por RNAi se observa una expresión homogénea de Prc a lo largo de todo el conducto dorsal. Además, en algunas zonas se aprecia que la Prc penetra en el territorio correspondiente a los cardiomiocitos, llegando, en algunos, casos a rodearlos por completo (Figura 22D a L). El territorio de expresión de la Prc se expande hasta alcanzar regiones ocupadas por núcleos somáticos, sobre todo en la región más posterior del corazón, en el segmento A8. Este fenotipo contrasta fuertemente con el de los animales silvestres en los que los niveles de expresión de la pericardina son ligeramente más altos en el corazón en comparación con la aorta (comparar 22C con 22F). En estos animales, la Prc nunca se expande dentro de la región ocupada por los cardiomiocitos y en ningún caso rodea por completo a ninguna de estas células (Figura 22A a C).

Contrariamente, las líneas que sobre-expresan Cf2 muestran un fuerte descenso en la expresión de Prc, llegando esta a desaparecer en zonas concretas dentro de la región anterior aorta. Este último fenotipo también se aprecia, si bien de manera más leve, en regiones más posteriores de los embriones que sobre-expresan Cf2 (Figura 22M a R).

Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que Cf2 juega un papel importante en las primeras etapas de la diferenciación cardiaca. Es más, la gran diferencia observada en los niveles de expresión de Prc en situaciones de sobre-expresión o pérdida de función de Cf2 podría ser reflejo de la existencia de diferencias en cuanto al número de células pericárdicas. *Zfh1* es un factor de transcripción que se expresa en todas las células pericárdicas pero no se expresa en cardiomiocitos (Postigo et al. 1999; Santos et al. 2004; Liu et al. 2006; Nguyen et al. 2006; Sellin et al. 2009). Decidimos realizar tinciones con un anticuerpo anti *Zfh1* para comprobar si, efectivamente Cf2 disminuye a consecuencia de su sobre-expresión. Como se observa en la Figura 23 en embriones que carecen de función Cf2 se observa un fuerte incremento del número de células pericárdicas (Figura 23B–D; comparar con Figura 23A). De hecho, se aprecia la aparición de células *Zfh1* positivas en territorios externos al conducto dorsal (ver flechas, el número de células pericárdicas aumenta en respuesta a la pérdida de función de). El análisis de las líneas en las que se ha

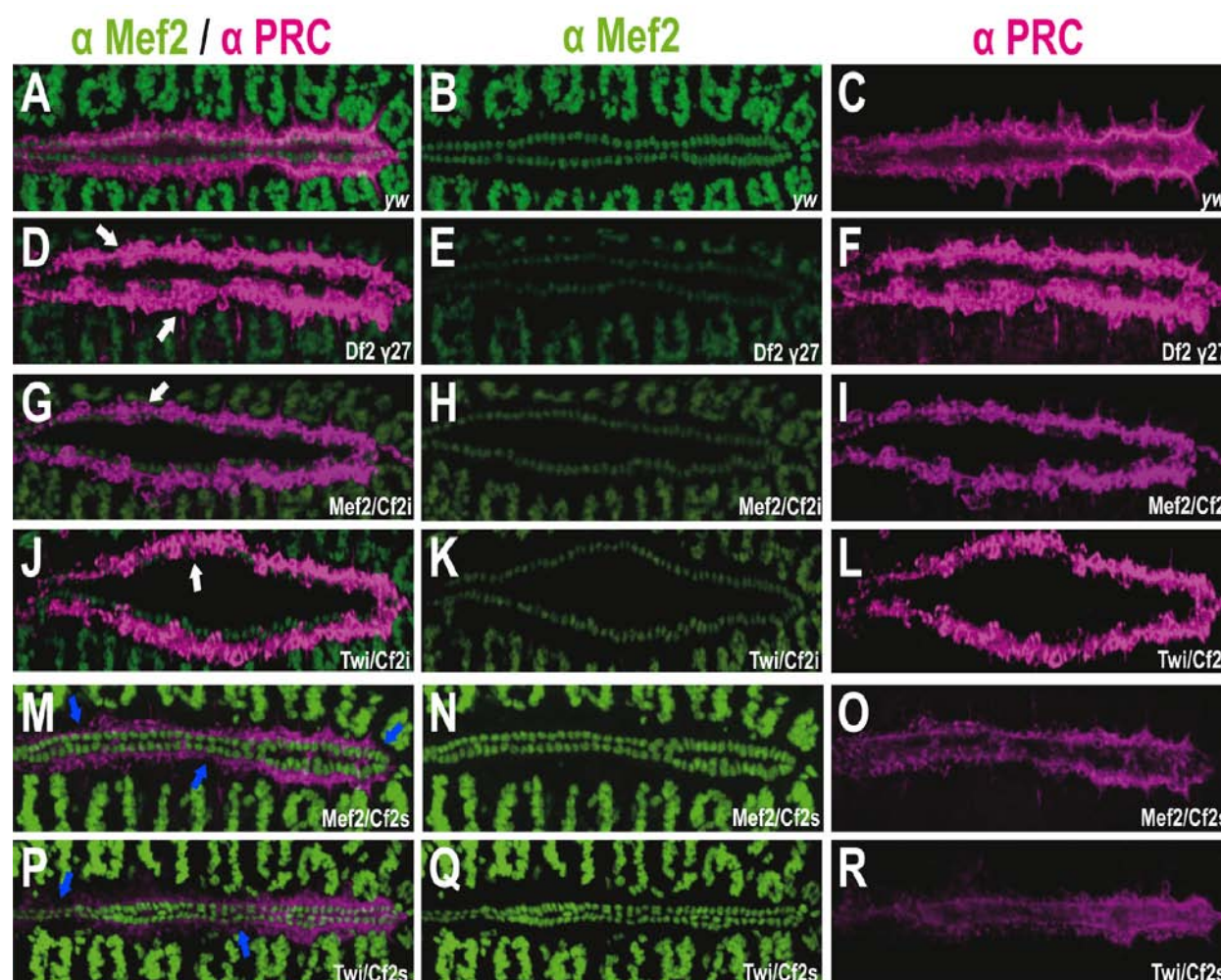


Figura 22. Expresión de PRC en las líneas en estudio. Determinación de la expresión de PRC. Se muestra la superposición de las tinciones anti Mef2 y anti PRC (A, D, G, J, M, N) y las tinciones individuales, anti Mef2 (B, E, H, K, N, Q) y anti PRC (C, F, I, L, O, R) en región dorsal de embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. A, B, C Embrión yw. D, E, F Embrión homocigoto Df2y27. G, H, I Embrión homocigoto Mef2/Cf2i. J, K, L Embrión homocigoto Twi/Cf2i. M, N, O Embrión heterocigoto Mef2/Cf2s. P, Q, R Embrión heterocigoto Twi/Cf2s.

interferido la expresión de Cf2 confirmo que, en efecto, esta pérdida se debe específicamente a la pérdida de función de Cf2 (Figura 23C y D). Como era de esperar, las líneas que sobre-expresan Cf2 muestran una disminución en el número de células que expresan Zfh1 (Figura 23E y F). Estos resultados confirman nuestra hipótesis sobre la participación de Cf2 en las primeras etapas de la diferenciación cardíaca. Cf2 no se expresa en las células pericárdicas, por lo que lo más probable es que la pérdida de función de Cf2 permita que un número de células mayor del debido sea especificado como célula pericárdica. Cuando Cf2 se sobre-expresa un menor número de células adquiriría un destino no muscular, disminuyendo el número de células pericárdicas. Sin embargo, al igual que en el caso de los cardiomiocitos, las células pericárdicas pertenecen a diferentes linajes.

En general, según los marcadores que expresan, las células pericárdicas se podrían dividir en dos grupos, células pericárdicas *tin* positivas y células pericárdicas *odd skipped* positivas (*odd*). Estos

dos grupos de células a su vez se pueden dividir en sub-grupos, uno de los cuales está formado por las células Tin^+ que expresan el factor de transcripción *even skipped* (*eve*) (ver Figura 6). Ambos grupos de células corresponden a los dos principales linajes de células pericárdicas. Por tanto, con objeto de determinar si los niveles de expresión de Cf2 afectan a todos los linajes de células pericárdicas decidimos analizar la expresión de *Eve*, *Odd* y *Tin* en situaciones de pérdida de función, total o parcial, y sobre-expresión de Cf2.

En primer lugar fue analizada la expresión del factor de transcripción *Eve*. Como se muestra en la Figura 24, *Eve* se expresa en dos células pericárdicas Tin^+ por hemisegmento del conducto dorsal (T3-A8), lo que facilita en gran medida el análisis de su expresión. *Eve* también es expresado en los núcleos del músculo somático DA1. Estos núcleos expresan elevados niveles de *Mef2*, mientras que las células pericárdicas al no ser musculares no expresan este factor de transcripción.

Dado que el músculo DA1 y las células pericárdicas se encuentran muy próximos en el embrión,

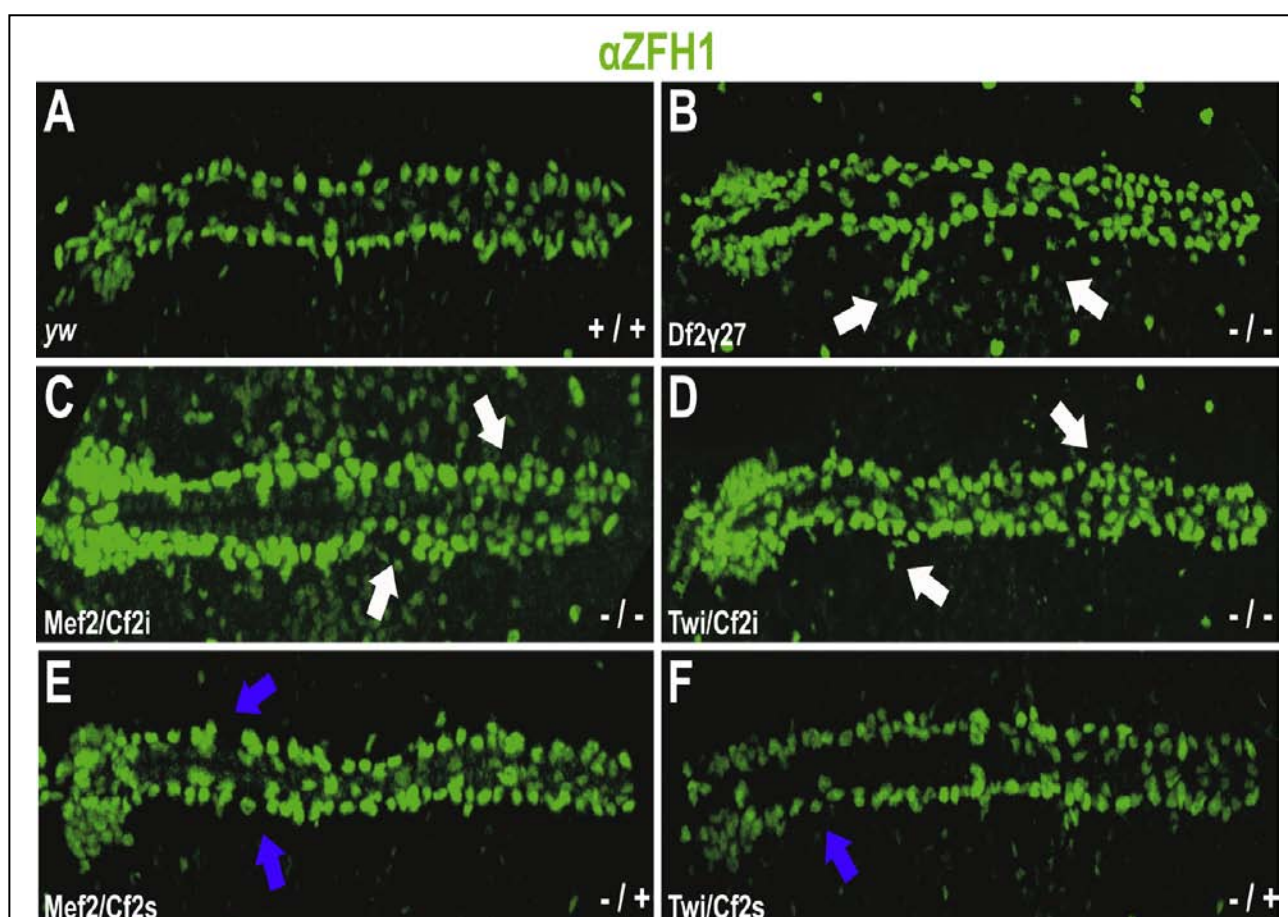


Figura 23. Expresión de *Mef2* en las líneas en estudio. Se muestran los resultados obtenidos tras tinción contra *Zfh1* en región dorsal de embriones de 12 a 14 horas en las líneas en estudio. **A** Embrión *yw*. **B** Embrión homocigoto *Df2γ27*. **C** Embrión homocigoto *Mef2/Cf2i*. **D** Embrión homocigoto *Twi/Cf2i*. **E** Embrión heterocigoto *Mef2/Cf2s*. **F** Embrión heterocigoto *Twi/Cf2s*. **G** Embrión homocigoto *Mef2/Cf2s*. **H** Embrión homocigoto *Twi/Cf2s*. La aparición de células pericárdicas ectópicas se indica con flechas blancas (**B**, **C**, **D**) mientras que la falta de las mismas se indica con una flecha azul (**E**, **F**).

decidimos co-teñir con un anticuerpo anti Mef2 lo que nos permite identificar de manera inequívoca las células pericárdicas Eve+. Como se observa en la Figura 24, la pérdida de función, total o parcial, de Cf2 provoca un claro incremento en el número de células pericárdicas Eve+, apareciendo muchos segmentos con tres células de este linaje, siendo este incremento mayor en el caso de la pérdida total de función (Figura 24D a F, comparar con 17G-L). Como era de esperar, cuando Cf2 es sobre-expresado se observa un claro decremento en el número de células pericárdicas Eve+, si bien en ningún caso llegan a desaparecer todas las células de un hemisegmento (Figura 24M a R).

Estos resultados confirman que el número de células pericárdicas Eve+ depende, al menos parcialmente, de los niveles de Cf2. Es más, estos datos sugieren que posiblemente todo el linaje pericárdico Tin+ responda de la misma manera. Para comprobar este extremo, se realizaron

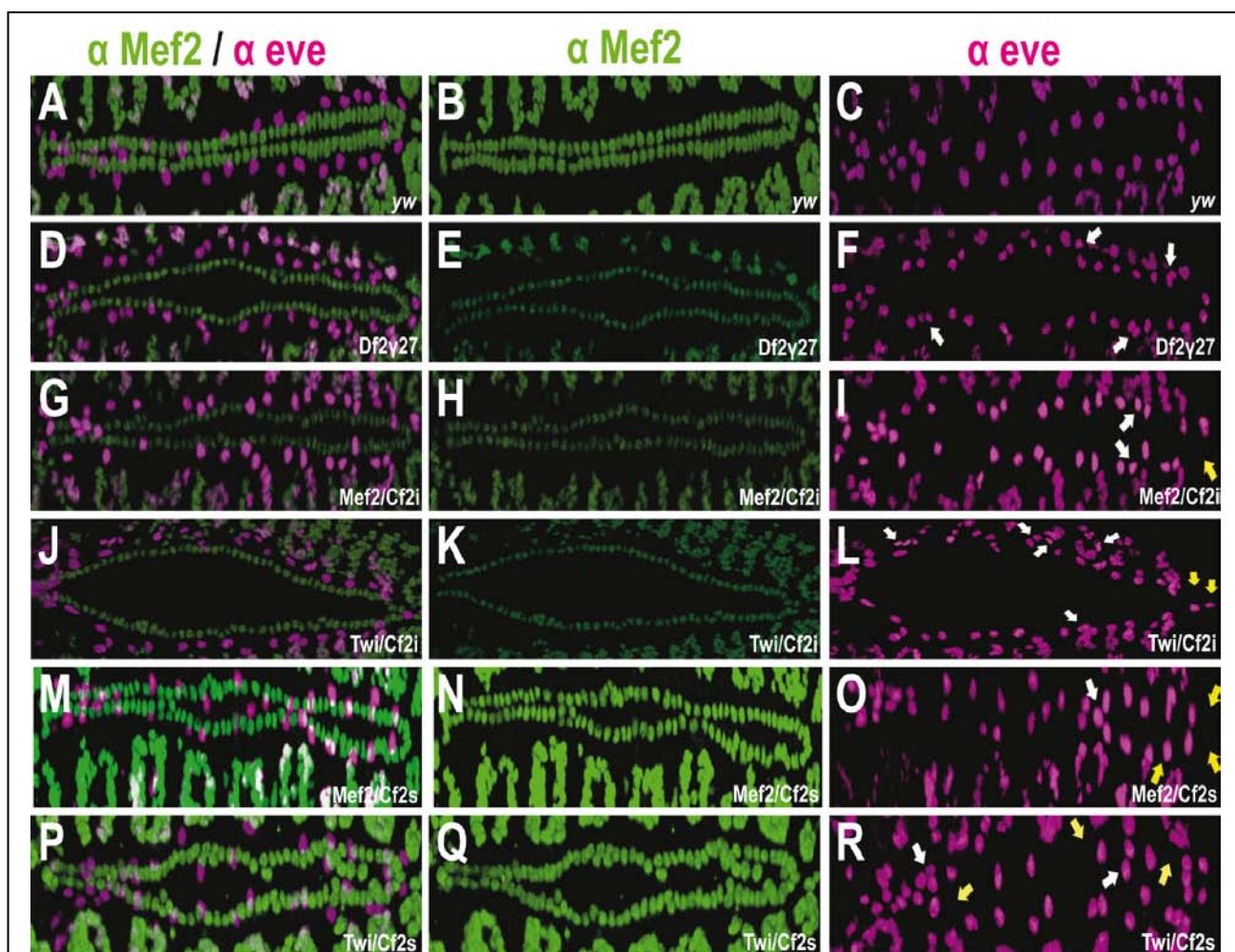
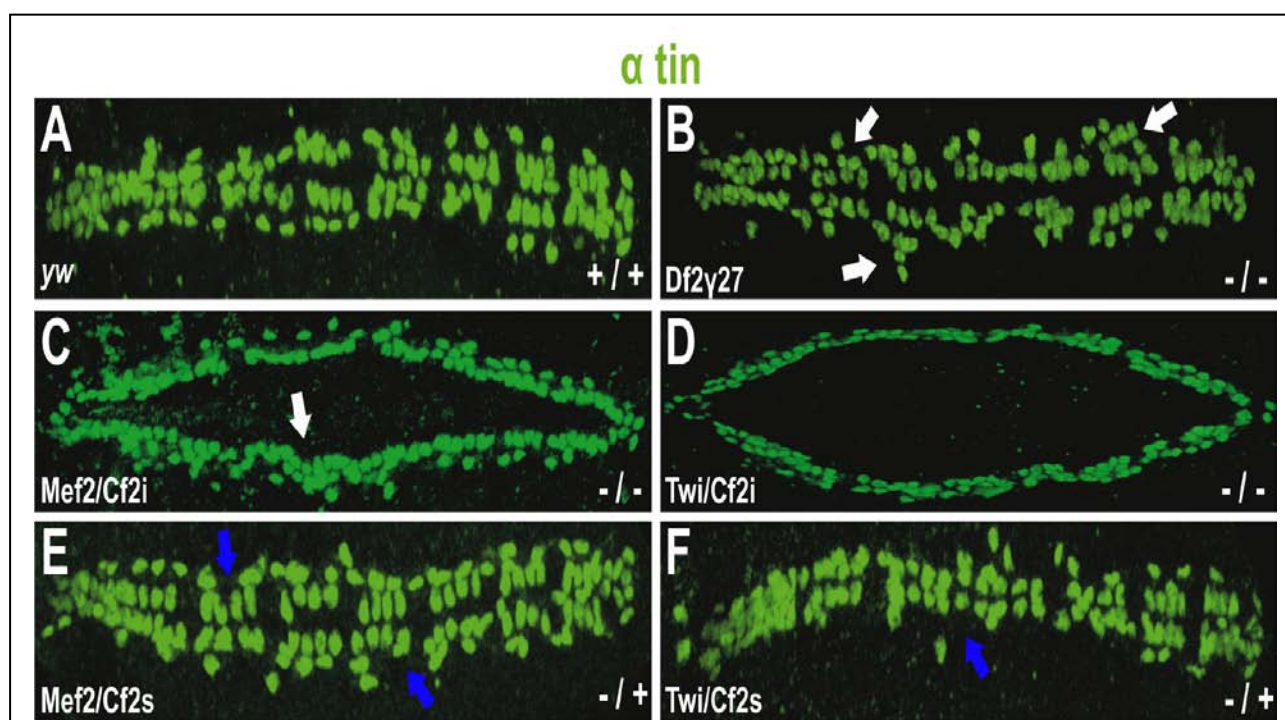


Figura 24. Cf2 y el linaje pericárdico Eve. Determinación del número de células pericárdicas que expresan Eve en las líneas en estudio. Se muestra la superposición de las tinciones anti Mef2 y anti Eve (A, D, G, J, M, P) así como las tinciones individuales anti Mef2 (B, E, H, K, N, Q) y anti Eve (C, F, I, L, O, R) en región dorsal de embriones de 12 a 14 horas de las líneas en estudio. A, B, C Embrión yw. D, E, F Embrión homocigoto Df2y27. G, H, I Embrión homocigoto Mef2/Cf2i. J, K, L Embrión homocigoto Twi/Cf2i. M, N, O Embrión heterocigoto Mef2/Cf2s. P, Q, R Embrión heterocigoto Twi/Cf2s. La presencia de células pericárdicas Eve se indica con flechas blancas mientras que la falta de las células pericárdicas Eve se indica con flechas amarillas.

tinciones con un anticuerpo anti Tin obteniéndose el resultado esperado; La falta de función Cf2 causa un incremento general en el número de células pericárdicas Tin⁺ mientras que su sobre-expresión causa el efecto opuesto (Figura 25).

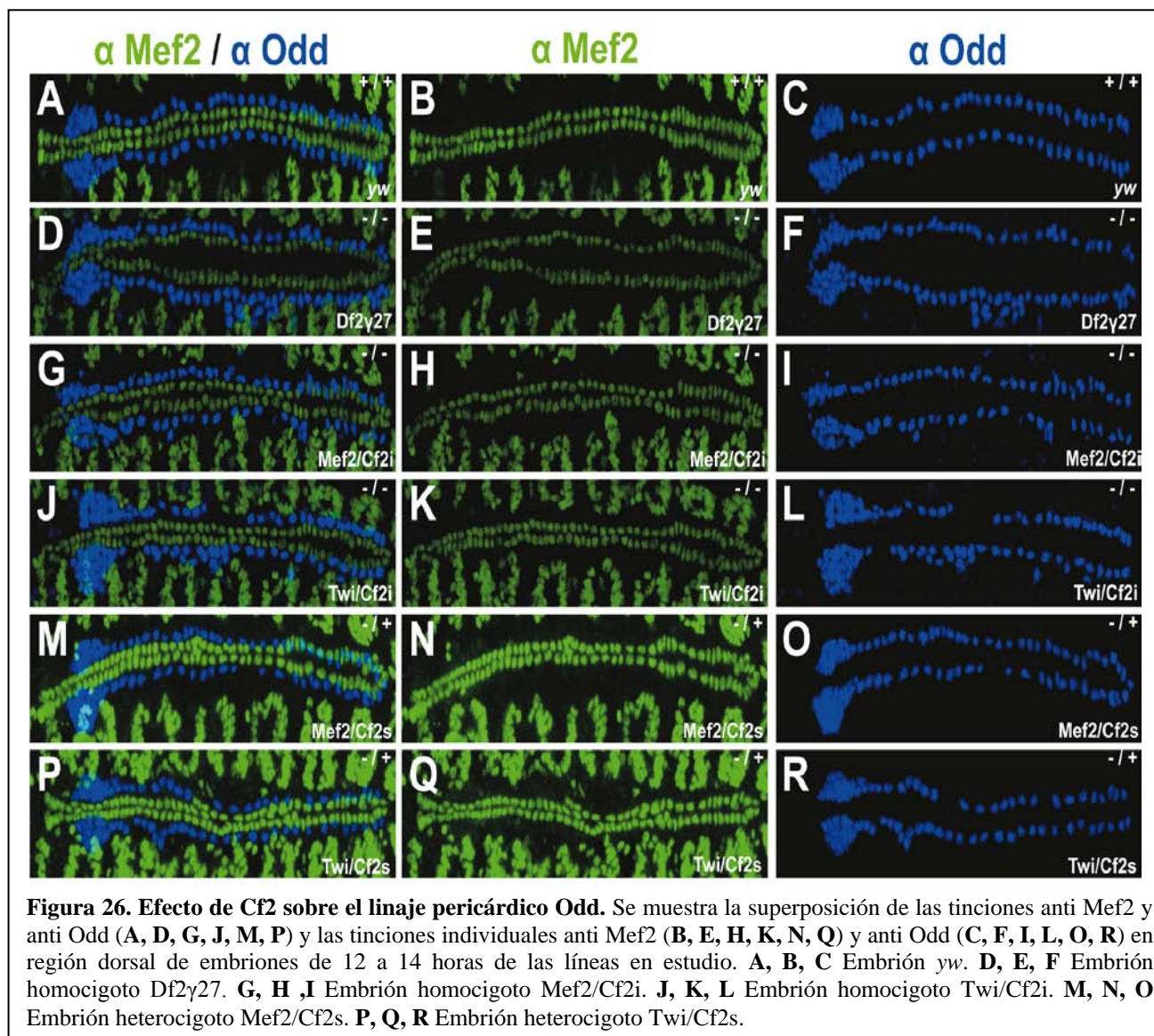
Tras comprobar que Cf2 juega un papel importante en la especificación de las células pericárdicas *tinman* positivas en general y Tin⁺ - Eve⁺ en particular, se realizó el mismo análisis en al segundo linaje de células pericárdicas, las células *Odd*⁺. Se realizaron tinciones dobles Mef2 – Odd en los diferentes fondos genéticos con objeto de determinar si la variación en los niveles de expresión de Cf2 induce variaciones en el número de células pericárdicas Odd positivas. En la Figura 26 se muestra el resultado de estos experimentos. Como se puede apreciar en la Figura 26, la ausencia de Cf2 causa un incremento en el número de células pericárdicas Odd (Figura 26D a L). En los embriones deficientes y en los que se ha interferido la expresión de Cf2 se aprecian acumulaciones de células pericárdicas Odd⁺ en diferentes regiones del embrión. Estas acumulaciones son especialmente frecuentes en la región más anterior de la aorta justo antes de las glándulas linfáticas (ver Figura 26 D a F). En este sentido, es importante destacar que el tamaño de las glándulas linfáticas de estos embriones es inferior a las de las líneas control *yw*, lo que podría indicar que parte de las células que debían formar estas glándulas son especificadas como células



pericárdicas a causa de la ausencia Cf2, o el descenso de sus niveles de expresión (Figura 26D a L, comparar con Figura 26A a C).

El análisis de las líneas que sobre-expresan Cf2 confirmó estos resultados. Tal y como se esperaba, estos embriones muestran un claro descenso en el número de células pericárdicas Odd+ (Figura 26M a R). Como se puede apreciar, estos embriones muestran huecos en el alineamiento de células pericárdicas en diferentes regiones. Además, contrariamente a lo observado en el caso de la pérdida de función de Cf2, las glándulas linfáticas de estos embriones parecen tener un mayor tamaño, lo que podría sugerir que Cf2 juega un papel en la especificación de este grupo de células (comparar Figura 26C con M a R). Sería muy interesante profundizar en el análisis de este último aspecto ya que, al menos en las etapas finales del desarrollo, Cf2 no se expresa en estas células.

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que Cf2 juega un papel importante en la especificación de las células pericárdicas, tanto las Tin+ como las Odd+. Dado que Cf2 no se



expresa en las células pericárdicas es muy probable que Cf2 participe en la especificación de los precursores cardiacos, participando en el control del balance entre las células pericárdicas y los cardiomiocitos. En este caso Cf2 participaría en las primeras etapas del desarrollo del corazón, lo que abre la posibilidad de que realice su función de forma independiente de Mef2 tal y como sucede en el caso de la diferenciación de la musculatura somática.

La función de Cf2 en la especificación de los precursores cardiacos es independiente de Mef2.

La función de Mef2 como principal regulador de la diferenciación miogénica es dependiente de dosis. Una pérdida parcial de función de este factor de transcripción tiene un reflejo en su capacidad para controlar el proceso de diferenciación. Cuando diferentes genes son expuestos a diferentes niveles de Mef2 responden de diferente manera, algunos genes necesitan altos niveles de Mef2 para ser activados mientras que otros responden a niveles muy bajos de esta proteína (Elgar et al. 2008). De igual forma, la función de Cf2 es dependiente de dosis. Como se ha mostrado con anterioridad, los fenotipos observados en el caso de animales homocigotos para la deficiencia $Df2\gamma^{27}$ son más fuertes que aquellos que muestran las líneas en las que la expresión de Cf2 ha sido interferida. De igual manera, los embriones heterocigotos de $Df2\gamma^{27}$ muestran una versión menos acusada de los mismos fenotipos. Estos animales muestran una pérdida ocasional de cardiomiocitos en contraste con el control, donde nunca se observa esta pérdida, o con sus hermanos homocigotos en los no solo se observa siempre una falta de cardiomiocitos sino que el número de células ausentes es mucho mayor (Figura 18 y Figura 27).

Con objeto de comprobar si la función de Cf2 en la especificación de los diferentes linajes cardiacos, cardiomiocitos y células pericárdicas, es independiente de Mef2 decidimos analizar los corazones de animales heterocigotos para ambos genes. Dado que la función de ambos genes es dependiente de dosis, si la función de Cf2 es dependiente de la de Mef2, una pérdida parcial de función de esta proteína debería producir un agravamiento en los fenotipos causados por una pérdida parcial de Cf2. En caso de que la función de Cf2 fuese independiente de Mef2 no debería observarse diferencia alguna. Se cruzaron animales $mef2^{30-5}/CyOkr\ Gal4;UAS\ GFP$ (Baker et al. 2005; Lovato et al. 2009) con individuos $Df2\gamma^{27}/CyO$, $Wg\ lacZ$ y su descendencia se analizó mediante inmuno-tinciones con anticuerpos anti Mef2, LacZ y GFP. Se analizaron los corazones de individuos que no expresan LacZ ni GFP, es decir son trans-heterocigotos para $mef2^{30-5}$ y $Df2\gamma^{27}$. Como control, ambas líneas se cruzaron con la línea control *yw* y se analizaron los animales que no

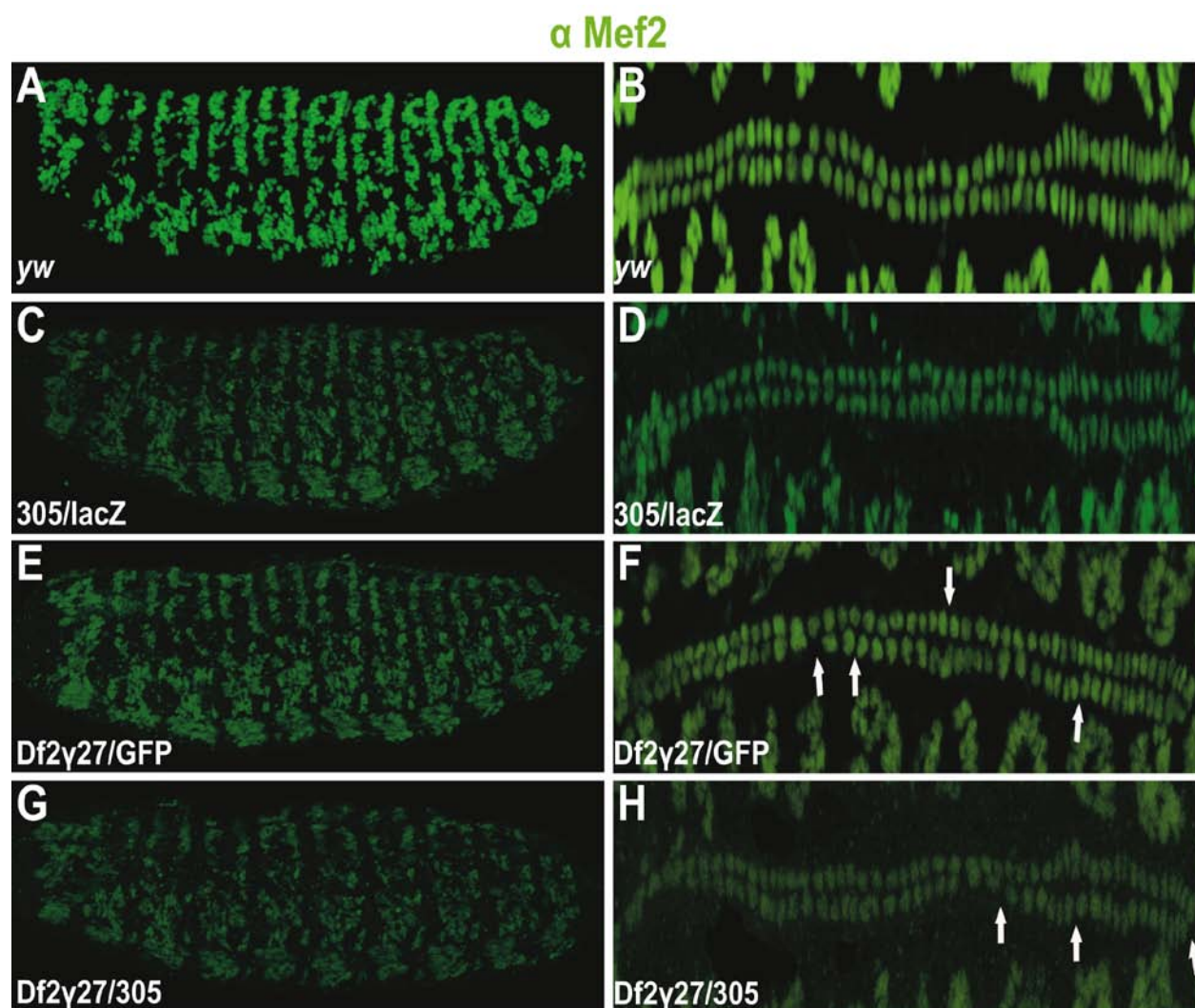


Figura 27. Expresión de Mef2 en líneas deficientes en Mef2 y Cf2. Se presentan los resultados obtenidos tras tinción contra Mef2 en embriones de 12 a 14 horas, de las líneas deficientes en estudio. Se muestra la tinción Mef2 en musculatura somática (**A, C, E, G**) y en región dorsal (**B, D, F, H**) de la línea control *yw* (**A, B**), la línea de deficiencia de Mef2, denominada como 305 (**C, D**), la de deficiencia de Cf2, *Df2γ27* (**E, F**) y el cruce de ambas líneas, denominado como *Df2γ27/305* (**G, H**). La falta de cardioblastos se indica con flechas blancas (**F, H**).

portan balanceador.

Como se puede observar en la Figura 27, los individuos heterocigotos deficientes en Mef2 (*mef2³⁰⁻⁵/+*) presentan un número normal de cardiomiocitos en conducto dorsal de embriones de 12 a 14 horas de desarrollo y unos niveles de Mef2 inferiores a los animales heterocigotos deficientes en Cf2. Estos últimos sí que presentan pérdidas en el número de cardioblastos en conducto dorsal. En el análisis de los individuos dobles hemocigotos, deficientes en Cf2 y Mef2, no hemos sido capaces de detectar variaciones significativas con respecto a los animales heterocigotos deficientes en Cf2 (*Df2γ²⁷/+*) lo que sugiere que una vez que Mef2 activa la expresión de Cf2, el papel de Cf2 como regulador miogénico ha de ser independiente de Mef2.

Discusión

Discusión

La miogénesis requiere de la interacción coordinada y diferencial de múltiples factores y co-factores que actúan de una manera secuencial a lo largo de la misma asegurando así la correcta formación de los diferentes linajes, somático, visceral y cardíaco, del sistema muscular. En este proceso, el factor de transcripción Mef2 juega un papel esencial tanto en *Drosophila* (Bour, O'Brien et al. 1995; Lilly, Zhao et al. 1995) como en vertebrados (Lin, Bour et al. 1997; Lin, Lu et al. 1998; Bi, Drake et al. 1999; Naya, Black et al. 2002). Mef2, para realizar su función como regulador transcripcional, interacciona diferencialmente con las secuencias de unión presentes en las regiones reguladoras de sus genes diana. Ahora bien, Mef2 no actúa de una manera independiente sino que forma parte de complejos multi-proteicos y es a través de estos que se une, directa o indirectamente, al DNA. En estos complejos Mef2 interactúa con otros co-factores. Algunos de estos factores son totalmente indispensables para llevar a cabo la especificación y diferenciación muscular, es decir para que cada célula adquiera el destino muscular que le corresponde en cada caso. La composición de estos complejos es variable en el espacio y en el tiempo, lo que permite a Mef2 interactuar con diferentes co-factores y diferentes “enhancers” a lo largo del desarrollo y en los diferentes tipos celulares musculares.

En la actualidad, tanto en vertebrados como en *Drosophila*, varios factores han sido descritos como co-factores de Mef2 en distintos tipos musculares. Entre los co-factores de Mef2 implicados en la génesis del músculo esquelético en vertebrados, están los cuatro miembros de la familia MyoD (myf5, MyoD, miogenina y MRF4). Todos ellos pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH (Molkentin, Black et al. 1995; Naidu, Ludolph et al. 1995), y se expresan exclusivamente en músculo somático. La expresión de cualquiera de ellos en una célula fibroblástica hace que esta adquiera un fenotipo muscular. En músculo cardíaco, en vertebrados, la Miocardina (proteína tipo SAP) ha sido descrita como un factor que potencia la actividad transcripcional de Mef2 aunque la forma en que se produce esta interacción es aún poco conocida (Creemers, Sutherland et al. 2006).

En *Drosophila*, los factores y co-factores que interaccionan con Mef2 son aún prácticamente desconocidos. No existen homólogos funcionales claros de MyoD en músculo somático. *Nautilus* fue identificado hace unos años como un homólogo de esta familia. Sin embargo, los análisis genéticos y bioquímicos descartaron que hiciera un papel similar al realizado por los miembros de la familia MyoD en el músculo esquelético de vertebrados (Balagopalan, Keller et al. 2001). Más recientemente, varios grupos han propuesto a *Twist*, también miembro de la familia de factores de transcripción del tipo bHLH, como un factor que puede jugar este un papel en la miogénesis

temprana, durante la especificación. El papel de este factor se restringiría a la etapa inicial de la miogénesis ya que posteriormente este factor baja mucho su expresión llegando a dejar de expresarse en muchas de las células musculares (Taylor 2000). Otros posibles co-factores como por ejemplo, *tinman*, *muscleblind* o *lameduck* se expresan solo en grupos de células musculares a lo largo del desarrollo embrionario (Frasch 1995; Artero et al. 1998; Frasch 1999; Kremser et al. 1999; Sellin et al. 2009).

En este contexto, otro candidato a interaccionar y/o cooperar con Mef2 podría ser el factor de transcripción Cf2. Las características de este factor de transcripción, su expresión mayoritariamente muscular (Bagni, Bray et al. 2002), que apareciera como un gen diana de Mef2 en el rastreo realizado por el grupo de E. Furlong (Sandmann, Jensen et al. 2006) y que se hayan identificado agrupaciones de sitios de unión para Mef2 y Cf2 en muchos de los “enhancers” que activan genes musculares (García-Zaragoza, Mas et al. 2008) nos hizo pensar que podría ser un candidato ideal a colaborar con Mef2 en la miogénesis. Adicionalmente, y aun cuando Mef2 inicia su expresión antes, el patrón de expresión espacio-temporal de Cf2 durante el desarrollo embrionario es casi equivalente al de Mef2 (Bour, O'Brien et al. 1995; Lilly, Zhao et al. 1995; Bagni, Bray et al. 2002). Además, se ha descrito recientemente que ambos factores se requieren para que la activación de los genes musculares estructurales sea máxima (Bagni, Bray et al. 2002; García-Zaragoza, Mas et al. 2008; Tanaka, Bryantsev et al. 2008).

En este trabajo se presenta el estudio funcional de Cf2 durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* y su relación con el factor de transcripción Mef2. Más concretamente, se analiza el efecto de la variación de los niveles de Cf2 en músculo somático y músculo cardíaco durante el desarrollo embrionario. El análisis fenotípico se ha realizado en tres grupos de líneas de *Drosophila* diferentes: embriones que sobre-expresan Cf2, embriones que presentan niveles bajos de la proteína Cf2 por interferencia del mensajero y embriones que no expresan Cf2 por delección del locus de Cf2 (Lane and Kalderon 1993; Ricard, Jakubowski et al. 2001; Bagni, Bray et al. 2002).

Los primeros análisis realizados con las líneas transgénicas ya revelaron el papel esencial de este factor de transcripción. Las líneas doblemente homocigotas, para el “driver” y el UAS correspondiente, para la sobre-expresión o para la interferencia, eran letales. Es decir, fuertes variaciones en los niveles de este factor de transcripción resultan en letalidad del 100% de los embriones, en el caso de la sobre-expresión, o las larvas tardías, en el caso de la interferencia (Figura 11E y Figura 12). Este letalidad sugiere que Cf2 es esencial para el normal desarrollo del sistema muscular embrionario-larvario. Los embriones homocigotos que sobre-expresan Cf2 están

completamente desorganizados desde etapas tempranas del desarrollo (Figura 12 paneles C y E).

Otro aspecto importante que se observa en los embriones que sobre-expresan Cf2, independientemente del “driver” utilizado, es que los músculos parecen tener mayor tamaño, valorado como número de núcleos por fibra, (Figura 13). Es importante resaltar que el efecto contrario, es decir una disminución del tamaño de las fibras musculares, se aprecia en los embriones deficientes para Cf2 (Figura 13). La presencia de este fenotipo de disminución del tamaño de las fibras en embriones en los que la expresión de Cf2 ha sido interferida demuestra que el efecto observado se debe específicamente a la falta de Cf2 y no a la de cualquiera de los otros locus cubiertos por la deficiencia utilizada.

Cf2 modula la actividad de Mef2 durante el desarrollo embrionario.

Paralelamente, se ha llevado a cabo un estudio de la expresión de Mef2 en las diferentes líneas con el fin de analizar la relación entre la expresión de los dos factores, Mef2 y Cf2. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que una vez iniciada la expresión de Cf2 por Mef2, la expresión de Mef2 es dependiente de Cf2 (Figura 14-15). Las variaciones en los niveles de expresión de Cf2 producen cambios aproximadamente proporcionales en los niveles de Mef2. Así, de acuerdo con datos previos descritos en la literatura (Bagni, Bray et al. 2002) en embriones homocigóticos para la deficiencia *Df*²⁷, y que por tanto carecen del gen *Cf2*, prácticamente no se observa expresión ni de la proteína ni del mRNA de Mef2 (Figura. 14B y 15D). De igual forma, en los animales en los que se ha interferido la expresión de Cf2 se observa una fuerte caída en los niveles de mensajero de ambos genes, siendo esta mayor para *Cf2* que para *Mef2* (Figura. 14 C-D y 15D). Por el contrario, en el caso de la sobre-expresión, donde se aprecian niveles de mensajero de *Cf2* entre 4 y 5 veces más altos que en el control *yw*, los niveles de mRNA de *Mef2* suben entre 2 y 2,5 veces (Figura 15D). Estos resultados confirman que Cf2 participa, directa o indirectamente, en la regulación transcripcional de Mef2. Ha sido recientemente descrito que Cf2 modula la actividad transcripcional de Mef2 durante el desarrollo embrionario (Tanaka, Bryantsev et al. 2008). Estos nuevos datos indican que esta modulación no se produce únicamente a nivel de interacción entre proteínas, directa o indirecta, si no que va más allá al depender la expresión de *Mef2* de la de *Cf2*. Es decir entre ambos factores existe una interdependencia que se refleja tanto a nivel transcripcional de los propios genes, como a nivel funcional en la regulación de la transcripción. El mecanismo que subyace a esta interdependencia entre ambos factores es actualmente desconocido aunque se sabe que inicialmente, la activación de Cf2 depende de Mef2 (Bagni et al, 2002). Desde un punto de vista biológico, que ambos factores se sitúen justo a continuación el uno del otro en la red génica

que controla la miogénesis, podría indicar la existencia de un mecanismo que permitiría regular diferencialmente la expresión ambos factores en todos los linajes musculares en desarrollo (Figura 28). Según este mecanismo, bastaría con regular la expresión de uno de los dos factores para que el otro reaccione en consecuencia, tanto a nivel transcripcional como funcional. Este mecanismo aseguraría unos niveles de expresión de Mef2 y Cf2 adecuados para el desarrollo completo del proceso de diferenciación de los diferentes linajes musculares. Para confirmar definitivamente esta hipótesis sería necesario realizar estudios adicionales, como podría ser el análisis de los efectos de las variaciones de expresión de Cf2 en fondos genéticos deficientes para los diversos factores relacionados con la expresión de Mef2, como Tin o Twi, en diferentes momentos del desarrollo. También sería interesante estudiar la variación de los niveles de expresión de Cf2 en linajes musculares específicos como pueden ser el conducto dorsal o la musculatura visceral.

Cf2 como modulador del proceso miogénico.

Los datos presentados en este trabajo indican que en el programa miogénico de *Drosophila*, existen otros dos procesos esenciales que se ven afectados cuando se alteran los niveles de expresión de Cf2. Uno de ellos es el control del número de núcleos se aparecen en una fibra somática particular. Es decir, el control del proceso que regula o decide cuantos mioblastos competentes de fusión se fusionan con un precursor dado. El otro es la especificación de las células

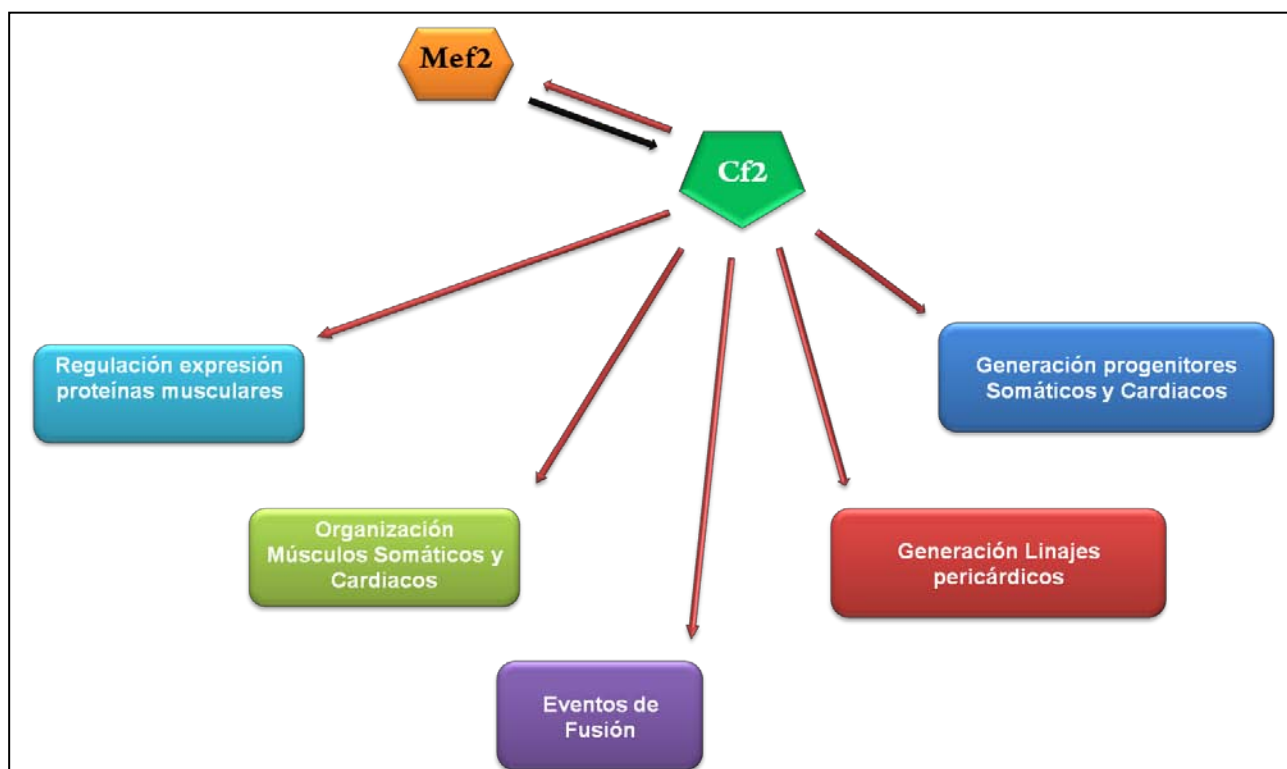


Figura 28. Cf2 y los procesos miogénicos. Esquema que recopila la información obtenida a lo largo de este estudio. Los eventos en los que Cf2 participa identificados en este trabajo se indican con flechas de color rojo.

fundadoras. Ambos procesos, han comenzado en la etapa 11 del desarrollo, coincidiendo con estadios tempranos del retroceso de la banda germinal. Es más, la proliferación celular en el mesodermo dorsal finaliza en esta etapa.

1.- Cf2 regula el número de núcleos por fibra.

El número de núcleos que aparecen en cada fibra muscular depende del número de eventos de fusión que se producen entre una célula fundadora y los mioblastos competentes de fusión. El número de eventos de fusión que se producen en cada fibra en particular es determinado por la célula fundadora y no por el número de mioblastos competentes de fusión disponibles ya que estos están presentes muy en exceso (Richardson et al. 2008). El proceso de especificación del progenitor del músculo DA1 no se conoce con precisión, sin embargo, se ha descrito que durante este proceso se generan tanto el precursor DA1 como el linaje pericárdico Eve+. El gen *eve* es expresado tanto por las células pericárdicas como por el precursor DA1 y su expresión se mantiene en los núcleos del músculo diferenciado (Carmena, Murugasu-Oei et al. 1998; Park, Fujioka et al. 1998; Fujioka, Wessells et al. 2005). El doble marcaje Eve/Mef2 permite por tanto identificar inequívocamente los núcleos pertenecientes a este músculo. La cuantificación de los núcleos presentes en el músculo DA1, ha permitido confirmar que diferentes niveles de expresión de Cf2 tienen como consecuencia una variación en el número de núcleos presente en cada fibra muscular. La sobre-expresión de Cf2 produce un incremento de alrededor del 25% en el número medio de núcleos presentes en el músculo DA1, que son núcleos Mef2 + Eve + (Figura 16G – I) su ausencia causa el efecto contrario, una disminución de aproximadamente un 25% (Fig. 16 y Tabla X).

Una posible explicación a esta observación podría buscarse en la dependencia de los niveles de Mef2 respecto a los de Cf2 descrita anteriormente. Así, la variación en el número de núcleos en respuesta a los diferentes niveles de expresión de Cf2 podría ser un reflejo de los cambios en los niveles de Mef2. Es decir, las variaciones observadas podrían ser consecuencia de los cambios en la expresión de Mef2, siendo el único, o al menos el principal, papel de Cf2 en este proceso modular la expresión Mef2. De ser cierta esta hipótesis, la sobre-expresión de Mef2 debería de resultar en un fenotipo similar a la de Cf2, si no más acusado. La sobre-expresión de Mef2 no causa un incremento en el número de núcleos. Estos resultados confirman que Cf2 participa directamente en el control del número de núcleos por fibra, es decir, el número de fusiones que sufre una célula fundadora. Es más, Cf2 modula el número de núcleos por fibra independientemente de su papel como modulador de la expresión de Mef2 y posiblemente de la función de este factor de transcripción. Esta preponderancia funcional de Cf2 sobre Mef2 es muy sorprendente ya que, en

todos los estudios realizados hasta el momento, Cf2 siempre ha sido situado como modulador o co-factor de Mef2.

En conclusión, estos resultados apuntan a Cf2 como uno de los principales reguladores del proceso de fusión, contribuyendo a determinar el número de núcleos presentes en un sincitio muscular. Hasta el momento no tenemos evidencias de cómo Cf2 podría estar regulando este proceso. Una posibilidad muy interesante, y que merecería la pena explorar en un futuro, es que participe en la regulación de los genes directamente implicados en el proceso de fusión. Como se ha comentado anteriormente, el número de fusiones necesario para la diferenciación de una determinada fibra viene definido por la célula fundadora (Dworak et al. 2002; Menon et al. 2005). Es tentador especular que Cf2 sea un regulador directo de la expresión de los genes que participan en el proceso de fusión, al menos en las células fundadoras. Si, por ejemplo, Cf2 es capaz de regular directamente Duf (Ruiz-Gomez, Coutts et al. 2000). Embriones deficientes en Duf forman músculos mono-nucleados y los mioblastos competentes mueren por macrófagos mientras que los fundadores expresan niveles normales de genes específicos *Kr*, *eve*, etc. Existen diversos factores, como Duf o antisocial (rollin Pebbels) que se expresan específicamente en membrana de fundador y participan en la determinación del número de eventos de fusión (Menon, Osman et al. 2005). La sobre-expresión de Cf2 tendría como consecuencia la sobre-expresión de estas proteínas y en consecuencia el incremento del número de fusiones que se producen. De igual, manera la caída en los niveles de expresión tendría el efecto inverso. Sería muy interesante sobre-expresar o interferir Cf2 en células fundadoras concretas y estudiar el número de núcleos presentes en los músculos derivados de ellas. En este contexto se podría así mismo analizar la expresión de los genes responsables de llevar a cabo el proceso de fusión. Se podría comprobar si, efectivamente, hay una relación entre la expresión de estos genes en la membrana de estas células, los niveles de expresión de Cf2 y el número de eventos de fusión que sufre la célula fundadora.

2.- Cf2 participa en especificación de las células fundadoras.

Un aspecto esencial a estudiar en el análisis de Cf2 como modulador del proceso miogénico es si los cambios en la expresión de Cf2 producían alteraciones del patrón muscular embrionario, es decir de la identidad de cada músculo particular. Todos los músculos individuales presentes en cada segmento son especificados inicialmente como mioblastos fundadores a partir de los cuales se diferencia cada fibra muscular tras fusionarse cada célula fundadora con un determinado número de mioblastos competentes de fusión. La identidad de cada músculo individual se define mediante la expresión diferencial y característica de factores de transcripción y otras proteínas expresadas de

manera específica en cada célula fundadora particular. Tras el proceso de fusión, se genera en cada segmento abdominal un total de 30 pares de músculos hipodérmicos. Todos estos músculos son fisiológicamente iguales, aunque cada uno de ellos es único en términos de tamaño, forma, puntos de anclaje e inervación (Crossley 1978; Bate 1993; Baylies, Bate et al. 1998).

Utilizando la estrategia ya descrita para inducir variaciones en los niveles de expresión de Cf2 o su pérdida de función, se observó que los embriones que tienen niveles altos de esta proteína presentan con frecuencia músculos adicionales. En estos embriones frecuentemente se observa la duplicación de los músculos laterales (Fig 17F, asterisco magenta), y/o alteraciones en el tamaño y morfología de diversos paquetes musculares, como es el caso del músculo DA3 que se muestra en la figura 17E (flechas magentas). Este músculo, si bien conserva su anclajes normales, presenta una morfología más similar a otros músculos de su entorno como el DA2 lo que podría sugerir que se esté produciendo una especificación parcialmente incorrecta. De manera inversa, la pérdida total o parcial de Cf2 causa la pérdida de algunos músculos. En estos embriones se observa, por ejemplo, la pérdida del músculo LT3 (Figura 17D), que en el caso de la sobre-expresión de Cf2 se encuentra duplicado (Figura. 17F, asterisco magenta). Esta pérdida o adquisición de músculos parece aleatoria tanto en cuanto al músculo que la sufre como a los segmentos afectados. Sin embargo, parece haber algunos músculos más proclives que otros a sufrir estas alteraciones. Por ejemplo el músculo LL4 ya mencionado aparece frecuentemente afectado por estos cambios tanto en los animales sobre-expresantes como en los interferidos. Esto indicaría que Cf2 juega un papel más predominante en la especificación de determinados precursores frente a otros. Esta posibilidad se ajusta en gran medida a lo descrito hasta el momento en lo que se refiere a la especificación de las células fundadoras. Como ya se ha mencionado, la identidad de estas células viene determinada por la expresión de diferentes proteínas que se expresan en combinaciones particulares en cada fundador. Es por tanto esperable que la variación de los niveles de Cf2 afecten de manera diferente a unos precursores que a otros.

En este mismo contexto, era importante conocer si el efecto producido por los cambios en niveles de Cf2 se extendía también a otros linajes musculares como el cardíaco. A diferencia de las células musculares somáticas, los cardiomiocitos son células uninucleadas. Así, el número final de estas células en el conducto dorsal del embrión es el reflejo del número inicial de ellas especificadas como cardiomiocitos en las primeras fases de la diferenciación cardíaca. Si Cf2 realiza en el linaje cardíaco funciones similares a las que realiza en la musculatura somática deberíamos observar fenotipos similares. Es decir, las variaciones en los niveles de Cf2 deberían inducir cambios de identidad celular y por tanto se observarían incrementos o disminuciones en el número de

cardiomiositos. El análisis del conducto dorsal en respuesta a los diferentes niveles de expresión de Cf2 reveló que su ausencia produce una disminución del número de cardiomiositos mientras que el aumento de sus niveles de expresión genera aumentos notables en el número de cardioblastos con fenómenos frecuentes de hiperplasia (Figura 18 y Tabla XI).

Los embriones con una pérdida total o parcial de la función de Cf2 presentan un número total de cardiomiositos siempre menor de 104, el número de estos presente en los animales silvestres. Sin embargo, en los embriones que presentaban un incremento de la expresión de Cf2 se observaba un aumento en el número de cardiomiositos frente al total en un embrión silvestre (Tabla XI; Figura 18, comparar paneles 18A y C, flechas blancas). La disminución o aumento del número de cardiomiositos parece que está en relación más o menos directa con las variaciones en los niveles de Cf2, según se observan los cambios en embriones con ausencia total, parcial o sobre-expresión de este factor de transcripción. Con el fin de contestar a la pregunta de si estos cardiomiositos extra eran funcionales o no, se realizaron tinciones con marcadores específicos de tipo celular, como la pericardina, secretada por las células pericárdicas, Mef2, Tinman, MyHC y TnT para las células cardíacas funcionales (no mostrados). Todos los cardiomiositos de más observados en los embriones que sobre-expresan Cf2 son positivos para estos marcadores, demostrando que estas células son cardiomiositos funcionales (Figuras 19 y 20).

El conducto dorsal de *Drosophila* presenta al menos dos tipos de cardiomiositos según su linaje y los marcadores que expresan, cardioblastos Tin⁺ y Svp⁺ (ver Figura 6). Con objeto de investigar si estos cambios de identidad se producían en los dos linajes cardíacos, o solo en uno de ellos, se realizaron tinciones con distintos marcadores específicos para cada linaje de cardioblasto como Svp, Tin y Mef2 (Figura 21, Tabla XII). Este estudio demostró que las alteraciones afectan por igual a ambos tipos de cardiomiositos, los Svp⁺ y los Tin⁺, presentes en cada hemisegmento del conducto dorsal. Estos resultados indican que Cf2 participa en la especificación de los distintos linajes de cardiomiositos presentes en el conducto dorsal. Es importante resaltar que la sobre-expresión de Mef2 no indujo cambio alguno en el número de cardiomiositos presentes en el conducto dorsal. Es más, animales doblemente heterocigotos para Cf2 y Mef2 no mostraron cambios en el número de células cardíacas al compararlos con animales heterocigotos solo para Cf2. Es decir, al igual que en el caso de los músculos somáticos, las alteraciones inducidas por los cambios en los niveles de expresión de Cf2 son independientes de los cambios producidos por Cf2 en la expresión de Mef2.

Una vez establecido que las células extra que observábamos al aumentar los niveles de expresión de Cf2 eran cardiomiositos funcionales era importante establecer cuál era el linaje del que

procedían estas células, y lo que es más importante, si algún otro linaje celular era afectado en el proceso. Se ha comentado previamente que la especificación de las células musculares se produce antes de la etapa 11 del desarrollo, etapa en la que finaliza su proliferación. Esta etapa coincide con el posible inicio en la expresión de Cf2 (ver apartado 4 en Introducción). Si Cf2 juega un papel en la toma de decisiones de destino, y teniendo en cuenta su perfil de expresión temporal, es razonable pensar que lo realice en esta etapa temprana. Con posterioridad a la etapa 11 no hay proliferación celular en el territorio cardíaco y si bien la falta de cardiomiocitos en los mutantes de pérdida de función se podría achacar a la muerte celular, el aumento en el número de cardioblastos no. Aunque en estos momentos no se puede determinar con exactitud la naturaleza de estas células adicionales, lo más probable tengan su origen en un desequilibrio en el balance de especificación cardiomiocitos/células pericárdicas, ya que ambos linajes se originan en el mismo territorio. Si la falta o ganancia de células en respuesta a los niveles de expresión de Cf2 se debieran a una alteración en este equilibrio, deberíamos observar fenotipos recíprocos en las células pericárdicas. Es decir, si en los animales que sobre-expresan Cf2 hay un desequilibrio en la especificación hacia los cardiomiocitos, es de esperar que haya un descenso en el número de células pericárdicas. En el caso de la pérdida de función total o parcial de Cf2 se observaría la situación inversa, un aumento en el número de células pericárdicas.

Las células pericárdicas se localizan alrededor del conducto dorsal (ver Figura 6) y su función no es del todo conocida aunque se sabe que son importantes en el mantenimiento del flujo y la contracción cardíaca (Chartier, Zaffran et al. 2002; Fujioka, Wessells et al. 2005; Johnson, Burnett et al. 2007). Las tinciones dobles con anti-pericardina, secretada por las células pericárdicas, y anti-Mef2, que identifica a las células musculares, realizadas en embriones procedentes de las distintas líneas en estudio, con pérdida total, parcial o aumento de los niveles de Cf2, apoyan fuertemente que esta proteína juega un papel importante en las primeras etapas de la diferenciación cardíaca (Figura 22). Es más, estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre la participación de Cf2 en el proceso de toma de decisiones en la especificación de los diferentes linajes durante el desarrollo del corazón. En embriones con pérdida total o parcial de Cf2, los cuales presentan una disminución en el número de cardiomiocitos, se aprecia un claro aumento en el número de células pericárdicas (Zfh1+). Por el contrario, los embriones que sobre-expresan Cf2 se observa un descenso en el número de células pericárdicas (Figura 23). El análisis del linaje pericárdico se realizó siguiendo la presencia tanto de la pericardina, secretada por estas células (Chartier, Zaffran et al. 2002), como de Zfh1, que es un factor que se expresa en todas las células pericárdicas, con independencia de su origen, pero no en los cardiomiocitos (Santos and Lehmann 2004; Liu, Su et al. 2006; Sellin,

Drechsler et al. 2009). Sin embargo, al igual que en el caso de los cardiomiocitos, las células pericárdicas pertenecen a distintos linajes. Según los marcadores que expresan, las podríamos dividir en Tin⁺ y Odd⁺. Algunas de las células Tin⁺ son a su vez Eve⁺ (ver figura 6; Zaffran et al. 2006).

El análisis de los diferentes linajes en los distintos fondos genéticos reveló que el número de células pericárdicas Tin⁺, tanto Eve⁺ como Eve⁻, y Odd⁺ (Figuras 24,25 y 26) depende, al menos parcialmente, de los niveles de expresión del factor de transcripción Cf2. Ahora bien, al igual que en el caso de la especificación de los cardiomiocitos, la especificación del linaje pericárdico parece ser dependiente de los niveles de Cf2, pero no de los niveles de Mef2 (Figura 27). La sobre-expresión de Mef2 no produce cambios en el número de células pericárdicas, independientemente de su linaje celular, como tampoco aparecen en los animales doblemente heterocigóticos para ambos factores de transcripción, Cf2 y Mef2. En resumen, podemos afirmar que los datos presentados en esta tesis demuestran que Cf2 juega un papel importante en la especificación de las células pericárdicas, tanto las Tin⁺ como las Odd⁺. Dado que Cf2 no se expresa en las células pericárdicas es muy probable que, como ya hemos sugerido, esté implicado en el proceso de adopción de destino celular en las etapas tempranas del desarrollo, concretamente participaría en el control del balance entre las células pericárdicas y los cardiomiocitos.

En cada hemisegmento embrionario se desarrollan seis cardioblastos, todos ellos expresan Mef2 y requieren del mismo para su correcta diferenciación (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995). Por su parte Tin se expresa en un gran número de cardioblastos, no en todos, siendo necesario para que estas células adquieran un destino miocárdico funcional. La expresión de Tinman varia a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Mientras que entre los hemisegmentos abdominales A2 y A7, Tinman se expresa en los cuatro cardioblastos más posteriores, en los hemisegmentos T3 y A1 Tin se expresa en los 6 cardioblastos. Por su parte en el hemisegmento A8, que tan solo presenta cuatro cardioblastos, Tin solo se expresa en los dos cardioblastos más posteriores. Se ha demostrado que la población de cardiomiocitos Tin⁺ no se ve afectada en mutantes deficientes en componentes de maquinaria que participa en la vía de división asimétrica. Estos cardiomiocitos por tanto, han de generarse mediante procesos de división simétrica (Gajewski et al, 2000). Es más, se sabe que, al menos entre los segmentos A2 y A7, los cardioblastos Tin positivos se generan partir de dos progenitores distintos que se dividen a su vez de forma simétrica para generar cada uno dos cardioblastos Tin⁺ por hemisegmento (Ward et al. 2000).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que Cf2 es capaz de modular el número total de cardioblastos Tin⁺ en el conducto dorsal de *Drosophila*. Actualmente desconocemos el mecanismo por el que Cf2 ejerce este efecto sobre la población de cardioblastos Tinman positivos. El efecto de Cf2 sobre este tipo de cardioblastos se podría explicar mediante diferentes hipótesis. Cf2 podría actuar a nivel de la especificación de los progenitores cardiacos Tin positivos. Otra opción sería que Cf2 actuase a nivel de la división simétrica de los progenitores una vez que estos han sido especificados, haciendo que se modifique el número de divisiones simétricas que experimentan los progenitores. En la primera hipótesis las variaciones en los niveles de Cf2 serían capaces de provocar el aumento o la disminución. Si este fuese el caso cabría esperar que se produjesen alteraciones de valor par en el número de cardioblastos. En la segunda hipótesis se produciría una alteración en el número de divisiones simétricas que experimenta un progenitor como respuesta a la variación en los niveles de Cf2. Esto supondría que las variaciones en los niveles de Cf2 afectarían a la capacidad de un progenitor especificado para realizar la división simétrica que genera los cardioblastos Tin⁺. Este comportamiento podría explicar variaciones pares e impares en el número de cardioblastos Tin⁺ por hemisegmento. Los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la segunda hipótesis ya que se han apreciado variaciones pares e impares en el número de cardioblastos Tin positivos de las líneas en estudio (Figura 21).

En este trabajo se ha analizado la población de células pericárdicas Tin positivas apreciándose que esta población es sensible a las variaciones en los niveles de Cf2. La mayor parte de esta población, al igual que los cardioblastos Tin positivos, se genera por procesos de división simétrica, pero el mecanismo por el cual actúa Cf2 sobre esta población pericárdica ha de ser distinto ya que Cf2 en situaciones normales no se expresa en el territorio pericárdico, por lo que la variación en los niveles de Cf2 debe actuar de forma indirecta en la generación del linaje pericárdico Tin positivo.

Dentro de los hemisegmentos A2 a A7, los dos cardioblastos más anteriores no expresan Tin, expresando en su lugar el factor Svp. Estos cardioblastos constituyen las válvulas de entrada y salida del conducto dorsal y carecen de funcionalidad muscular. El origen de estos cardioblastos difiere del de los cardioblastos Tin positivos. Hoy en día se sabe que los dos cardioblastos svp positivos de los hemisegmentos A2 a A7 se generan como resultado de procesos de división asimétrica a partir de dos progenitores distintos que se dividen para generar cada uno un cardioblasto Svp positivo y una célula pericárdica Odd positiva, que es también Svp positiva (Gajewski, Choi et al. 2000).

Al igual que ocurre en la musculatura somática en el desarrollo del corazón la división asimétrica

depende de la distribución desigual de Numb en el progenitor en división. Esta distribución desigual produce la segregación de Numb a solo una de las dos células hijas que bloquea de aquí en adelante la expresión de Notch, permitiendo que esta célula hija adquiriera un fenotipo distinto al de la otra (que continua manteniendo activa la vía de señalización Notch). El mecanismo molecular por el cual *numb* se opone a la vía de señalización Notch no se conoce pero se ha demostrado que ambas proteínas pueden interactuar físicamente (Guo, Jan et al. 1996). En este trabajo hemos mostrado que Cf2 es capaz de modular el número de cardioblastos Svp en el conducto dorsal de *Drosophila*, demostrando que el aumento en los niveles de Cf2 es capaz de provocar un incremento en el número de cardioblastos Svp positivos en el conducto dorsal de *Drosophila*. De forma opuesta la disminución o eliminación de los niveles de Cf2 produce la reducción del número de cardioblastos de este tipo. Estos resultados, como los obtenidos en el análisis de los músculos somáticos embrionarios, sugieren que Cf2 ha de participar de forma directa o indirecta, en el proceso de división asimétrica. Los resultados obtenidos tras el análisis del desarrollo de los músculos somáticos indican que Cf2 estimula o potencia la adopción de un destino celular concreto que se opone al otro destino celular generado durante la división asimétrica en circunstancias normales. Cf2, por tanto, parece actuar como un factor que proporciona robustez al entramado génico encargado de generar las diversas poblaciones mesodérmica.

Conclusiones

Conclusiones

1. Cf2 es esencial para el desarrollo normal del sistema muscular embrionario-larvario en *Drosophila*, ya que cuando reducimos la presencia de mRNA de Cf2 mediante la microinyección de dsRNAi contra Cf2 en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, se aprecia la desorganización de las estructuras musculares que provoca un acusado incremento de la letalidad embrionaria.
2. Los niveles de Cf2 han de estar regulados de forma estricta, pues la variación acusada de los niveles de expresión de Cf2 en las líneas de la sobre-expresión (Gal4/Cf2s), interferencia (Gal4/Cf2i) o deficiencia (Df2 γ^{27}) de Cf2 es incompatible con la vida causando una letalidad del 100% en individuos homocigotos de las líneas con niveles alterados de Cf2.
3. Cf2 modula los niveles de expresión de Mef2 en etapas en las que ambos factores se co-expresan durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, siendo capaz de modificar tanto los niveles de mRNA de Mef2, como los de proteína, indicando la existencia de un posible mecanismo de retroalimentación entre ambos factores en etapas de la diferenciación muscular.
4. Cf2 participa en el control del número de núcleos por fibra muscular, mediante un mecanismo actualmente desconocido, pudiendo participar, o bien en el proceso de diferenciación de mioblastos competentes de fusión, o en el mecanismo que genera el sincitio muscular mediante el proceso de fusión.
5. Cf2 participa en el establecimiento del número total de fibras somáticas por hemisegmento embrionario, provocando la variación en los niveles de Cf2, alteraciones en el número final de músculos por segmento embrionario, mediante un mecanismo desconocido que puede actuar o bien a nivel de la especificación de los progenitores (alterando las variaciones en Cf2 el número inicial de progenitores musculares), o bien en procesos de división asimétrica de los progenitores.
6. Alteraciones en los niveles de Cf2 producen cambios en la morfología y organización de los músculos somáticos, alterando el patrón muscular embrionario.
7. Variaciones en los niveles de Cf2 provocan alteraciones en el número total de cardioblastos, afectando a la morfología del conducto dorsal en embriones de *Drosophila* (y probablemente a su funcionalidad).
8. Las variaciones en los niveles de Cf2 afectan a la especificación de todos los linajes de cardioblastos, mediante un mecanismo actualmente desconocido que puede afectar o bien, al

proceso de especificación de los progenitores cardiacos, o a los procesos de división simétrica o asimétrica que experimentan los progenitores de cada tipo de cardioblasto durante la generación del conducto dorsal en *Drosophila*.

9. Cf2 participa en la determinación de los diferentes linajes de células pericárdicas, siendo capaz de modular el número total de células pericárdicas, mediante un mecanismo en el que la presencia de Cf2 potencia la adquisición de un destino muscular (somático o cardíaco) que se opone al destino pericárdico.

10. La función de Cf2 en la especificación y diferenciación de los precursores musculares (somáticos y cardiacos) es, al menos, parcialmente independiente de Mef2.

Bibliografía

- Abmayr, S. M. and C. A. Keller (1998). "Drosophila myogenesis and insights into the role of nautilus." Curr Top Dev Biol **38**: 35-80.
- Anant, S., S. Roy, et al. (1998). "Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in Drosophila." Development **125**(8): 1361-9.
- Arredondo, J. J., R. M. Ferreres, et al. (2001). "Control of Drosophila paramyosin/miniparamyosin gene expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription." J Biol Chem **276**(11): 8278-87.
- Arredondo, J. J., M. Mardahl-Dumesnil, et al. (2001). "Overexpression of miniparamyosin causes muscle dysfunction and age-dependant myofibril degeneration in the indirect flight muscles of Drosophila melanogaster." J Muscle Res Cell Motil **22**(3): 287-99.
- Artero, R., A. Prokop, et al. (1998). "The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2." Dev Biol **195**(2): 131-43.
- Azpiazu, N. and M. Frasch (1993). "tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila." Genes Dev **7**(7B): 1325-40.
- Azpiazu, N., P. A. Lawrence, et al. (1996). "Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm." Genes Dev **10**(24): 3183-94.
- Bagni, C., S. Bray, et al. (2002). "The Drosophila zinc finger transcription factor CF2 is a myogenic marker downstream of MEF2 during muscle development." Mech Dev **117**(1-2): 265-8.
- Baker, P. W., K. K. Tanaka, et al. (2005). "Adult myogenesis in Drosophila melanogaster can proceed independently of myocyte enhancer factor-2." Genetics **170**(4): 1747-59.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in Drosophila. Development. **110**: 791-804.
- Bate, M. and A. M. Arias (1991). "The embryonic origin of imaginal discs in Drosophila." Development **112**(3): 755-61.
- Bate, M. and A. Martinez-Arias (1993). The mesoderm and its derivatives. . The Development of Drosophila melanogaster, (ed. , :). C. S. H. L. Press. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **Vol. 2** pp. 1013-1090.
- Bate, M. and A. Martinez Arias (1993). The mesoderm and its derivatives. The development of Drosophila melanogaster. C. S. H. L. Press: 1077.
- Bate, M., E. Rushton, et al. (1991). "Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in Drosophila." Development **113**(1): 79-89.
- Baylies, M. K. and M. Bate (1996). "twist: a myogenic switch in Drosophila." Science **272**(5267): 1481-4.
- Baylies, M. K., M. Bate, et al. (1998). "Myogenesis: a view from Drosophila." Cell **93**(6): 921-7.
- Bernstein, S. I., P. T. O'Donnell, et al. (1993). "Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in Drosophila." Int Rev Cytol **143**: 63-152.
- Black, B. L. and E. N. Olson (1998). "Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 167-96.
- Bodmer, R. (1993). "The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila." Development **118**(3): 719-29.
- Bodmer, R. and T. V. Venkatesh (1998). "Heart development in Drosophila and vertebrates: conservation of molecular mechanisms." Dev Genet **22**(3): 181-6.

- Bour, B. A., M. A. O'Brien, et al. (1995). "Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis." *Genes Dev* **9**(6): 730-41.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-15.
- Bryantsev, A. L. and R. M. Cripps (2009). "Cardiac gene regulatory networks in Drosophila." *Biochim Biophys Acta* **1789**(4): 343-53.
- Buckingham, M. (1992). "Making muscle in mammals." *Trends Genet* **8**(4): 144-8.
- Buckingham, M. (1994). "Muscle differentiation. Which myogenic factors make muscle?" *Curr Biol* **4**(1): 61-3.
- Buckingham, M., D. Houzelstein, et al. (1992). "Expression of muscle genes in the mouse embryo." *Symp Soc Exp Biol* **46**: 203-17.
- Buckingham, M., S. Meilhac, et al. (2005). "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells." *Nat Rev Genet* **6**(11): 826-35.
- Campos-Ortega, J. A. and V. Hartenstein (1985). "The Embryonic development of Drosophila melanogaster. ." (Book) Springer-Verlag, Berlin. .
- Carmena, A., M. Bate, et al. (1995). "Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila embryogenesis." *Genes Dev* **9**(19): 2373-83.
- Carmena, A., S. Gisselbrecht, et al. (1998). "Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the Drosophila embryonic mesoderm." *Genes Dev* **12**(24): 3910-22.
- Carmena, A., B. Murugasu-Oei, et al. (1998). "Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis." *Genes Dev* **12**(3): 304-15.
- Ciglar, L. and E. E. Furlong (2009). "Conservation and divergence in developmental networks: a view from Drosophila myogenesis." *Curr Opin Cell Biol* **21**(6): 754-60.
- Creemers, E. E., L. B. Sutherland, et al. (2006). "Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development." *Development* **133**(21): 4245-56.
- Creemers, E. E., L. B. Sutherland, et al. (2006). "Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR." *Mol Cell* **23**(1): 83-96.
- Cripps, R. M., B. L. Black, et al. (1998). "The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during Drosophila myogenesis." *Genes Dev* **12**(3): 422-34.
- Cripps, R. M. and E. N. Olson (2002). "Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network." *Dev Biol* **246**(1): 14-28.
- Cripps, R. M., B. Zhao, et al. (1999). "Transcription of the myogenic regulatory gene Mef2 in cardiac, somatic, and visceral muscle cell lineages is regulated by a Tinman-dependent core enhancer." *Dev Biol* **215**(2): 420-30.
- Crossley, A. C. (1978). The morphology and development of the Drosophila muscular system. *The Genetics and Biology of Drosophila*. M. A. T. R. F. Wright. London. **Vol 2.**: 499-560.
- Currie, D. A. and M. Bate (1991). "The development of adult abdominal muscles in Drosophila: myoblasts express twist and are associated with nerves." *Development* **113**(1): 91-102.
- Chartier, A., S. Zaffran, et al. (2002). "Pericardin, a Drosophila type IV collagen-like protein is involved in the morphogenesis and maintenance of the heart epithelium during dorsal ectoderm closure." *Development* **129**(13): 3241-53.

- Debjani Das, R. A., D. Ashoka and Maneesha Inamdar (2008). "Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development " Cell and Tissue Research **Volume 331, Number 2**: 565-570.
- Dohrmann, C., N. Azpiazu, et al. (1990). "A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis." Genes Dev **4**(12A): 2098-111.
- Duan, H., J. B. Skeath, et al. (2001). "*Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development." Development **128**(22): 4489-500.
- Dworak, H. A. and H. Sink (2002). "Myoblast fusion in *Drosophila*." Bioessays **24**(7): 591-601.
- Dye, C. A., J. K. Lee, et al. (1998). "The *Drosophila* *sanpodo* gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin/tropomyosin-associated protein." Development **125**(10): 1845-56.
- Elgar, S. J., J. Han, et al. (2008). "*mef2* activity levels differentially affect gene expression during *Drosophila* muscle development." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 918-23.
- Fernandes, J., M. Bate, et al. (1991). "Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*." Development **113**(1): 67-77.
- Frasch, M. (1995). "Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal *Dpp* in the early *Drosophila* embryo." Nature **374**(6521): 464-7.
- Frasch, M. (1999). "Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis." Curr Opin Genet Dev **9**(5): 522-9.
- Frasch, M., T. Hoey, et al. (1987). "Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*." EMBO J **6**(3): 749-59.
- Frasch, M. and H. T. Nguyen (1999). "Genetic Control of Mesoderm Patterning and Differentiation During *Drosophila* Embryogenesis " Advances in Developmental Biochemistry **Volume 5**: 47.
- Fujioka, M., R. J. Wessells, et al. (2005). "Embryonic even skipped-dependent muscle and heart cell fates are required for normal adult activity, heart function, and lifespan." Circ Res **97**(11): 1108-14.
- Furlong, E. E., E. C. Andersen, et al. (2001). "Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development." Science **293**(5535): 1629-33.
- Gajewski, K., Y. Kim, et al. (1998). "Combinatorial control of *Drosophila* *mef2* gene expression in cardiac and somatic muscle cell lineages." Dev Genes Evol **208**(7): 382-92.
- Gajewski, K., Y. Kim, et al. (1997). "*D-mef2* is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development." EMBO J **16**(3): 515-22.
- Gajewski, K. M. and R. A. Schulz "CF2 represses Actin 88F gene expression and maintains filament balance during indirect flight muscle development in *Drosophila*." PLoS One **5**(5): e10713.
- García-Zaragoza, E., J. A. Mas, et al. (2008). "CF2 activity and enhancer integration are required for proper muscle gene expression in *Drosophila*." Mech Dev **125**(7): 617-30.
- Ghanim, M. and K. P. White (2006). "Genotyping method to screen individual *Drosophila* embryos prior to RNA extraction." Biotechniques **41**(4): 414, 416, 418.
- Gogos, J. A., T. Hsu, et al. (1992). "Sequence discrimination by alternatively spliced isoforms of a DNA binding zinc finger domain." Science **257**(5078): 1951-5.

- Gossett, L. A., D. J. Kelvin, et al. (1989). "A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes." Mol Cell Biol **9**(11): 5022-33.
- Greenspan, R. J. (1997). Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guo, M., L. Y. Jan, et al. (1996). "Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch." Neuron **17**(1): 27-41.
- Hsu, T., C. Bagni, et al. (1996). "The transcriptional factor CF2 is a mediator of EGF-R-activated dorsoventral patterning in Drosophila oogenesis." Genes Dev **10**(11): 1411-21.
- Hsu, T., J. A. Gogos, et al. (1992). "Multiple zinc finger forms resulting from developmentally regulated alternative splicing of a transcription factor gene." Science **257**(5078): 1946-50.
- Hughes, S. M. and P. C. Salinas (1999). "Control of muscle fibre and motoneuron diversification." Curr Opin Neurobiol **9**(1): 54-64.
- Jagla, K., M. Frasch, et al. (1997). "ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in Drosophila required for diversification of heart precursors." Development **124**(18): 3471-9.
- Johnson, A. N., L. A. Burnett, et al. (2007). "Defective decapentaplegic signaling results in heart overgrowth and reduced cardiac output in Drosophila." Genetics **176**(3): 1609-24.
- Kassar-Duchossoy, L., B. Gayraud-Morel, et al. (2004). "Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice." Nature **431**(7007): 466-71.
- Keller, C. A., M. A. Grill, et al. (1998). "A role for nautilus in the differentiation of muscle precursors." Dev Biol **202**(2): 157-71.
- Kelly, K. K., S. M. Meadows, et al. (2002). "Drosophila MEF2 is a direct regulator of Actin57B transcription in cardiac, skeletal, and visceral muscle lineages." Mech Dev **110**(1-2): 39-50.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (2000). "Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA." Nat Biotechnol **18**(8): 896-8.
- Kesper, D. A., C. Stute, et al. (2007). "Myoblast fusion in Drosophila melanogaster is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS)." Dev Dyn **236**(2): 404-15.
- Klapper, R., S. Heuser, et al. (2001). "A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of Drosophila melanogaster." Development **128**(13): 2517-24.
- Klapper, R., C. Stute, et al. (2002). "The formation of syncytia within the visceral musculature of the Drosophila midgut is dependent on duf, sns and mbc." Mech Dev **110**(1-2): 85-96.
- Kremser, T., K. Gajewski, et al. (1999). "Tinman regulates the transcription of the beta3 tubulin gene (betaTub60D) in the dorsal vessel of Drosophila." Dev Biol **216**(1): 327-39.
- Lane, M. E. and D. Kalderon (1993). "Genetic investigation of cAMP-dependent protein kinase function in Drosophila development." Genes Dev **7**(7A): 1229-43.
- Laski, F. A., D. C. Rio, et al. (1986). "Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing." Cell **44**(1): 7-19.
- Leptin, M. and B. Grunewald (1990). "Cell shape changes during gastrulation in Drosophila." Development **110**(1): 73-84.
- Lillie, J. W. and M. R. Green (1989). "Transcription activation by the adenovirus E1a protein." Nature **338**(6210): 39-44.

- Lilly, B., S. Galewsky, et al. (1994). "D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5662-6.
- Lilly, B., B. Zhao, et al. (1995). "Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*." Science **267**(5198): 688-93.
- Lin, M. H., B. A. Bour, et al. (1997). "Ectopic expression of MEF2 in the epidermis induces epidermal expression of muscle genes and abnormal muscle development in *Drosophila*." Dev Biol **182**(2): 240-55.
- Lin, M. H., H. T. Nguyen, et al. (1996). "Myocyte-specific enhancer factor 2 acts cooperatively with a muscle activator region to regulate *Drosophila* tropomyosin gene muscle expression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4623-8.
- Liu, M., M. Su, et al. (2006). "Functional conservation of zinc-finger homeodomain gene *zfh1/SIP1* in *Drosophila* heart development." Dev Genes Evol **216**(11): 683-93.
- Liu, Y. H., J. S. Jakobsen, et al. (2009). "A systematic analysis of Tinman function reveals Eya and JAK-STAT signaling as essential regulators of muscle development." Dev Cell **16**(2): 280-91.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lo, P. C. and M. Frasch (2003). "Establishing A-P polarity in the embryonic heart tube: a conserved function of Hox genes in *Drosophila* and vertebrates?" Trends Cardiovasc Med **13**(5): 182-7.
- Lockwood, W. K. and R. Bodmer (2002). "The patterns of wingless, decapentaplegic, and tinman position the *Drosophila* heart." Mech Dev **114**(1-2): 13-26.
- Lovato, T. L., M. M. Adams, et al. (2009). "A molecular mechanism of temperature sensitivity for mutations affecting the *Drosophila* muscle regulator Myocyte enhancer factor-2." Genetics **183**(1): 107-17.
- Mantrova, E. Y. and T. Hsu (1998). "Down-regulation of transcription factor CF2 by *Drosophila* Ras/MAP kinase signaling in oogenesis: cytoplasmic retention and degradation." Genes Dev **12**(8): 1166-75.
- Mantrova, E. Y., R. A. Schulz, et al. (1999). "Oogenic function of the myogenic factor D-MEF2: negative regulation of the decapentaplegic receptor gene thick veins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11889-94.
- Maqbool, T. and K. Jagla (2007). "Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*." J Muscle Res Cell Motil **28**(7-8): 397-407.
- Marco-Ferreres, R., J. J. Arredondo, et al. (2005). "Overexpression of troponin T in *Drosophila* muscles causes a decrease in the levels of thin-filament proteins." Biochem J **386**(Pt 1): 145-52.
- Marco-Ferreres, R., J. Vivar, et al. (2005). "Co-operation between enhancers modulates quantitative expression from the *Drosophila* Paramyosin/miniparamyosin gene in different muscle types." Mech Dev **122**(5): 681-94.
- Marín, M. C., J. R. Rodriguez, et al. (2004). "Transcription of *Drosophila* troponin I gene is regulated by two conserved, functionally identical, synergistic elements." Mol Biol Cell **15**(3): 1185-96.
- Martin, B. S., M. Ruiz-Gomez, et al. (2001). "A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo." Development **128**(17): 3331-8.

- Mas, J. A., E. Garcia-Zaragoza, et al. (2004). "Two functionally identical modular enhancers in *Drosophila* troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types." *Mol Biol Cell* **15**(4): 1931-45.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, et al. (2002). "Signaling chromatin to make muscle." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 763-72.
- Medioni, C., S. Senatore, et al. (2009). "The fabulous destiny of the *Drosophila* heart." *Curr Opin Genet Dev* **19**(5): 518-25.
- Menon, S. D., Z. Osman, et al. (2005). "A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*." *J Cell Biol* **169**(6): 909-20.
- Michelson, A. M., S. M. Abmayr, et al. (1990). "Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos." *Genes Dev* **4**(12A): 2086-97.
- Molkentin, J. D., B. L. Black, et al. (1995). "Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins." *Cell* **83**(7): 1125-36.
- Molkentin, J. D. and E. N. Olson (1996). "Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9366-73.
- Monier, B., M. F. Tevy, et al. (2007). "Downstream of homeotic genes: in the heart of Hox function." *Fly (Austin)* **1**(2): 59-67.
- Morin, S., G. Pozzulo, et al. (2005). "MEF2-dependent recruitment of the HAND1 transcription factor results in synergistic activation of target promoters." *J Biol Chem* **280**(37): 32272-8.
- Naidu, P. S., D. C. Ludolph, et al. (1995). "Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2707-18.
- Nguyen, H. T., R. Bodmer, et al. (1994). "D-mef2: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7520-4.
- Nguyen, H. T. and M. Frasch (2006). "MicroRNAs in muscle differentiation: lessons from *Drosophila* and beyond." *Curr Opin Genet Dev* **16**(5): 533-9.
- Nguyen, H. T. and X. Xu (1998). "*Drosophila* mef2 expression during mesoderm development is controlled by a complex array of cis-acting regulatory modules." *Dev Biol* **204**(2): 550-66.
- Olson, E. N. (2006). "Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart." *Science* **313**(5795): 1922-7.
- Olson, E. N. and W. H. Klein (1994). "bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out." *Genes Dev* **8**(1): 1-8.
- Park, Y., M. Fujioka, et al. (1998). "*Drosophila* homeobox gene eve enhances trol, an activator of neuroblast proliferation in the larval CNS." *Dev Genet* **23**(3): 247-57.
- Paululat, A., S. Breuer, et al. (1999). "Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*." *Cell Tissue Res* **296**(1): 151-60.
- Paululat, A., A. Holz, et al. (1999). "Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis." *Mech Dev* **83**(1-2): 17-26.
- Ponzielli, R., M. Astier, et al. (2002). "Heart tube patterning in *Drosophila* requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling." *Development* **129**(19): 4509-21.
- Postigo, A. A., E. Ward, et al. (1999). "zfh-1, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis." *Mol Cell Biol* **19**(10): 7255-63.

- Potthoff, M. J. and E. N. Olson (2007). "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." Development **134**(23): 4131-40.
- Raghavan, K. V. and L. Pinto (1985). "The cell lineage of the muscles of the *Drosophila* head." J Embryol Exp Morphol **85**: 285-94.
- Ranganayakulu, G., R. A. Schulz, et al. (1996). "Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo." Dev Biol **176**(1): 143-8.
- Ranganayakulu, G., B. Zhao, et al. (1995). "A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*." Dev Biol **171**(1): 169-81.
- Reim, I. and M. Frasch (2005). "The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*." Development **132**(22): 4911-25.
- Rhyu, M. S., L. Y. Jan, et al. (1994). "Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells." Cell **76**(3): 477-91.
- Ricard, C. S., J. M. Jakubowski, et al. (2001). "*Drosophila* rab GDI mutants disrupt development but have normal Rab membrane extraction." Genesis **31**(1): 17-29.
- Richardson, B., K. Beckett, et al. (2008). "Visualizing new dimensions in *Drosophila* myoblast fusion." Bioessays **30**(5): 423-31.
- Richardson, B. E., K. Beckett, et al. (2008). "Live imaging of *Drosophila* myoblast fusion." Methods Mol Biol **475**: 263-74.
- Riechmann, V., U. Irion, et al. (1997). "Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm." Development **124**(15): 2915-22.
- Riechmann, V., K. P. Rehorn, et al. (1998). "The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*." Development **125**(4): 713-23.
- Rizki, T. M. (1978). The circulatory system and associated cells and tissues. The Genetics and Biology of Drosophila. M. A. a. T. R. F. Wright. **Vol 2B**: 397-452.
- Rochlin, K., S. Yu, et al. (2010). "Myoblast fusion: when it takes more to make one." Dev Biol **341**(1): 66-83.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-86.
- Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-53.
- Ruiz-Gomez, M. (1998). "Muscle patterning and specification in *Drosophila*." Int J Dev Biol **42**(3): 283-90.
- Ruiz Gomez, M. and M. Bate (1997). "Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb." Development **124**(23): 4857-66.
- Rushton, E., R. Drysdale, et al. (1995). "Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development." Development **121**(7): 1979-88.
- Sambrook and Russell (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, T., L. J. Jensen, et al. (2006). "A temporal map of transcription factor activity: *mef2* directly regulates target genes at all stages of muscle development." Dev Cell **10**(6): 797-807.

- Santos, A. C. and R. Lehmann (2004). "Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond." *Curr Biol* **14**(14): R578-89.
- Sellin, J., M. Drechsler, et al. (2009). "Antagonistic function of Lmd and Zfh1 fine tunes cell fate decisions in the Twi and Tin positive mesoderm of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **326**(2): 444-55.
- Shea, M. J., D. L. King, et al. (1990). "Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component." *Genes Dev* **4**(7): 1128-40.
- Singer, J. B., R. Harbecke, et al. (1996). "*Drosophila* brachyenteron regulates gene activity and morphogenesis in the gut." *Development* **122**(12): 3707-18.
- Skeath, J. B. and C. Q. Doe (1998). "Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS." *Development* **125**(10): 1857-65.
- Spana, E. P. and C. Q. Doe (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." *Neuron* **17**(1): 21-6.
- Stockdale, F. E. (1997). "Mechanisms of formation of muscle fiber types." *Cell Struct Funct* **22**(1): 37-43.
- Stute, C., K. Schimmelpfeng, et al. (2004). "Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on milliways(mili(Alk)) as receptor for Jeb signalling." *Development* **131**(4): 743-54.
- Tanaka, K. K., A. L. Bryantsev, et al. (2008). "Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in *Drosophila*." *Mol Cell Biol* **28**(5): 1616-29.
- Taylor, M. V. (2000). "A novel *Drosophila*, mef2-regulated muscle gene isolated in a subtractive hybridization-based molecular screen using small amounts of zygotic mutant RNA." *Dev Biol* **220**(1): 37-52.
- Taylor, M. V. (2002). "Muscle differentiation: how two cells become one." *Current biology*: 4.
- Taylor, M. V., K. E. Beatty, et al. (1995). "*Drosophila* MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature." *Mech Dev* **50**(1): 29-41.
- Thisse, B., C. Stoetzel, et al. (1988). "Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos." *EMBO J* **7**(7): 2175-83.
- Uemura, T., S. Shepherd, et al. (1989). "numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos." *Cell* **58**(2): 349-60.
- Valdez, M. R., J. A. Richardson, et al. (2000). "Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4." *Dev Biol* **219**(2): 287-98.
- Ward, E. J. (1997). Characterization of Odd-skipped protein pattern of accumulation during embryogenesis in *D. melanogaster*. *Ph.D. Dissertation*, . . St. Louis, Missouri, MO., St. Louis University.
- Ward, E. J. and D. E. Coulter (2000). "odd-skipped is expressed in multiple tissues during *Drosophila* embryogenesis." *Mech Dev* **96**(2): 233-6.
- Ward, E. J. and J. B. Skeath (2000). "Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo." *Development* **127**(22): 4959-69.
- Webster, N., J. R. Jin, et al. (1988). "The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator." *Cell* **52**(2): 169-78.

- Wolfstetter, G., M. Shirinian, et al. (2009). "Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm." Mech Dev **126**(8-9): 721-36.
- Yaich, L., J. Ooi, et al. (1998). "Functional analysis of the Numb phosphotyrosine-binding domain using site-directed mutagenesis." J Biol Chem **273**(17): 10381-8.
- Yin, Z., X. L. Xu, et al. (1997). "Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development." Development **124**(24): 4971-82.
- Zaffran, S. and M. Frasch (2002). "The beta 3 tubulin gene is a direct target of bagpipe and biniou in the visceral mesoderm of *Drosophila*." Mech Dev **114**(1-2): 85-93.
- Zaffran, S., A. Kuchler, et al. (2001). "biniou (FoxF), a central component in a regulatory network controlling visceral mesoderm development and midgut morphogenesis in *Drosophila*." Genes Dev **15**(21): 2900-15.
- Zaffran, S., I. Reim, et al. (2006). "Cardioblast-intrinsic Tinman activity controls proper diversification and differentiation of myocardial cells in *Drosophila*." Development **133**(20): 4073-83.